

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

**Obtención de péptidos alimentarios mediante hidrólisis enzimática con
efectos sobre la salud intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elvia Cruz Huerta

Directores

**Lourdes Amigo Garrido
Isidra Recio Sánchez**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**“OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ALIMENTARIOS MEDIANTE
HIDROLISIS ENZIMÁTICA CON EFECTOS SOBRE LA
SALUD INTestinal”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elvia Cruz Huerta

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Lourdes Amigo Garrido

Dra. Isidra Recio Sánchez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**“OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ALIMENTARIOS MEDIANTE
HIDROLISIS ENZIMÁTICA CON EFECTOS SOBRE LA
SALUD INTestinal”**

TESIS DOCTORAL

ELVIA CRUZ HUERTA

Madrid, 2015

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

**LOURDES AMIGO GARRIDO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC E
ISIDRA RECIO SÁNCHEZ, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC, DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

INFORMAN:

Que el presente trabajo titulado “OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ALIMENTARIOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON EFECTO SOBRE LA SALUD INTESTINAL” que constituye la Memoria que presenta la Licenciada en Nutrición ELVIA CRUZ HUERTA para optar al grado de Doctora, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM).

Y para que conste, firmamos el presente informe a 10 de Noviembre de 2015

Fdo.: Lourdes Amigo Garrido

Fdo.: Isidra Recio Sánchez

C/ Nicolás
Cabrera, 9.
Campus de la
Universidad
Autónoma de
Madrid
28049 Madrid

A mis padres y a mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la colaboración de un gran número de personas e instituciones que han facilitado los medios para que este trabajo llegue a su término. Mediante estas líneas, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes lo han hecho posible. En primer lugar, agradezco a mis directoras de Tesis, las Dras. Lourdes Amigo Garrido e Isidra Recio Sánchez, por brindarme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo, por toda la invaluable ayuda, por sus enseñanzas y el brillante asesoramiento científico que me han otorgado durante esta etapa.

Quiero agradecer la destacada contribución en este trabajo de la Dra. Blanca Hernández Ledesma, la ayuda y aportación de la Dra. Beatriz Miralles Buraglia, y la valiosa ayuda del Dr. Daniel Martínez Maqueda.

Agradezco a la Dra. María del Pilar Iniesta Serrano coordinadora en la Facultad de Farmacia del Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología, Molecular y Biomedicina de la Universidad Complutense de Madrid, y a la Dra. Almudena Porras Gallo tutora de esta Tesis, por su cordial orientación y por su ayuda para realizar todos los trámites administrativos.

A la Universidad Veracruzana y al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) del Gobierno Mexicano por la concesión de la beca para realizar esta Tesis Doctoral.

Al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), bajo la dirección de la Dra. M^a Victoria Moreno Arribas a quien agradezco por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, y a todo el personal que forma parte de este centro, gracias por toda la asistencia y ayuda. A la Dra. Nieves Corzo Jefa del Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos. A mi grupo de trabajo, Bioactividad y Alergenicidad de Proteínas y Péptidos Alimentarios (BIOPEP), de manera especial quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Mercedes Ramos, por su excelente y destacada labor que siempre ejerció frente al grupo BIOPEP, por su generosidad en la transmisión de conocimientos, por su actitud siempre llena de optimismo, por ser una persona admirable y ejemplar. Asimismo, expreso mi reconocimiento y gratitud a la Dra. Rosina López-Fandiño, por ejercer actualmente la labor de Jefa de Grupo de una manera excepcional. También agradezco a la Dra. Elena Molina, por toda la ayuda brindada, al

Dr. José Ángel Gómez Ruíz por su apoyo y asesoramiento en el inicio, a la Dra. Marta Miguel, al Dr. Iván López-Expósito, a la Dra. Josefina Belloque, a Constanza Talavera por iluminarnos los días con ese carisma tan especial, y a Alberto Fernández, por su ayuda técnica, por esos grandes momentos de charlas y por brindarme su amistad.

Quiero expresar mi gratitud al Dr. João Ernesto Carvalho, por permitirme realizar la estancia, en el Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) de la Universidad de Campinas, Sao Paulo Brasil. A su equipo de trabajo, en especial agradecer a la Dra. Karin Monteiro y al Dr. Humberto Spindola por su valiosa ayuda en la realización experimental. Así mismo agradezco a las Dras. Ana Lucia Ruiz y Ana Posenti y a todo el personal, por hacer mi estancia de estudio muy agradable.

Gracias a mis compañeros de grupo, porque ha sido un verdadero honor compartir con todos ustedes esta experiencia, especialmente a Samuel Fernández, por su inestimada ayuda en la realización de una parte de este trabajo y a Tomás Herrero por su valiosa ayuda experimental, a Marta Garcés, Alba Pablos, Daniel Lozano, Laura Perezábada, Silvia Moreno, Diego Morales y por supuesto agradecer a todos mis compañeros que han hecho su paso por el CIAL, a Laura Sánchez, Sara Benedé, Paqui Bravo, Rodrigo Jiménez, Gustavo Martos, Mar Contreras, Carlos Pineda, Isabel Herranz, David Cáceres, Sara Junco, Mónica Ullate, Almudena García, Luci Tudor, Paula Copovi, Marta Paunero e Ismael Carrillo. También a quienes han realizado una estancia de estudios en el CIAL y he tenido la fortuna de conocer y compartir grandes momentos a Mariana Villas Boas, Fernanda Drummond, Silvana Silveira, Aurora García, Blanca Serrada, Estefanía Moraga, Arizaid Hernández, Sebnem Simsek, Antonio Pérez, Miriam Moreno, Cristina Torres, Barbara Introna, Nerina Camino, Déborah Martínez, Amandine Lemaire, Angela Castro, Inajara Piotrowicz, Patricia Risso y Pablo Dorantes. A todos, gracias por el día a día, por todos los momentos compartidos, y por hacer que mi estancia en Madrid fuese aún más grata.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Iñigo Verdalet, por su ayuda incondicional, por sus consejos, y la confianza que siempre me ha otorgado para poder realizar este trabajo.

A mis amigos, Azalea, Jesús, Cesar, Thalia y Flora, porque siempre han estado presentes, animándome a seguir adelante para conseguir esta meta.

Y mi más profundo agradecimiento a mi familia, que aún en la distancia me apoyan de una manera sin igual, a mi hermano José Luís, a mis sobrinos y especialmente a mi hermana Verónica, por ser mi máximo apoyo en todo momento, por compartir y vivir tan de cerca todo este proceso. A mis padres por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, por ser mi soporte y mi razón de ser, por su incondicional apoyo a pesar del tiempo y la distancia. A mi madre, por ser un ejemplo de fortaleza y darme ánimos para seguir en todo momento y a mi padre, por animarme con tanto entusiasmo a iniciar este trabajo, sé la ilusión que te hacía que llegara la fecha en que culminara esta etapa, han pasado casi cinco años y aunque ya no estás físicamente de igual manera tú me acompañas, porque estoy segura que no te fuiste para estar lejos, sino para estar cerca de mí siempre, a ti te lo dedico.

Elvia

*“En el corazón de todos los inviernos vive una primavera palpitante, y
detrás de cada noche, viene una aurora sonriente”*

Khalil Gibran

ÍNDICE	1
ABSTRACT/RESUMEN	5
LISTA DE ABREVIATURAS	13
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	15
INTRODUCCIÓN	19
1. Proteínas lácteas y proteínas de soja	21
1.1. Caseínas	22
1.1.1. α_{S1} -caseína	24
1.1.2. β -caseína	24
1.1.3. α_{S2} -caseína	25
1.1.4. κ -caseína	25
1.2. Proteínas de suero	25
1.2.1. β -Lactoglobulina	26
1.2.2. α -Lactoalbúmina	26
1.2.3. Seroalbúmina	27
1.2.4. Inmunoglobulinas	27
1.2.5. Lactoferrina	28
1.3. Proteínas de soja	28
2. Digestión de proteínas y péptidos alimentarios	30
3. Péptidos con actividad sobre la función intestinal	34
3.1. Péptidos que favorecen la absorción de minerales	35
3.1.1. Caseinofosfopeptidos	36
3.1.2. Péptidos de suero lácteo capaces de tener afinidad al hierro	50
3.2. Péptidos con actividad estimulante de la producción de mucinas	51
3.3. Péptidos con actividad antiulcerogénica	56
3.4. Péptidos que modulan la proliferación celular. Lunasina de soja	58

4. Aplicación de la peptidómica en el estudio de proteínas y péptidos lácteos bioactivos	62
4.1. Identificación de péptidos presentes en productos lácteos	62
4.2. Identificación de péptidos tras la digestión gastrointestinal de productos lácteos	65
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. Preparación del hidrolizado de caseína con pepsina de grado alimentario	73
2. Preparación del hidrolizado trípico a partir del subproducto derivado de caseína y enriquecimiento en CPPs mediante precipitación selectiva	73
3. Preparación de hidrolizados de grado alimentario a partir de un aislado proteínas de suero	74
4. Preparación del hidrolizado trípico de grado alimentario a partir del concentrado de proteínas de suero enriquecido en β -Lg	75
5. Simulación de la digestión gastrointestinal del subproducto de caseína	75
6. Síntesis de péptidos	76
7. Caracterización de caseína y del subproducto de caseína	77
8. Análisis de caseinofosfopéptidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem	77
9. Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados de hidrolizados enzimáticos de proteínas de suero	78
10. Análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de hidrolizados de proteínas de suero	79
11. Determinación del perfil de aminoácidos de hidrolizados de proteínas de suero	80
12. Cultivo de células epiteliales intestinales secretoras de mucinas (HT29-MTX)	80
13. Ensayo de lectina conjugada a enzima	81
14. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a tiempo real (qRT-PCR)	82
15. Análisis cuantitativo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem del hidrolizado de caseína	84
16. Ensayo de ulcerogénesis experimental	85

17. Simulación de la digestión gastrointestinal de la lunasina en presencia del iso-inhibidor1 de Bowman-Birk	87
18. Análisis de los digeridos gastrointestinales de lunasina mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tandem	89
19. Ensayo de viabilidad celular de células HT-29 y Caco-2	89
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
1. Péptidos lácteos que favorecen la absorción de minerales	93
1.1. Formación de caseinofosfopéptidos a partir de un subproducto industrial de caseína mediante hidrólisis trípica vs. simulación de la digestión gastrointesinal	93
1.1.1. Caracterización de la caseína comercial, el subproducto de caseína y los productos de hidrólisis	94
1.1.2. Formación de CPPs a partir del subproducto de caseína mediante hidrólisis con tripsina	96
1.1.3. CPPs formados tras la simulación de la digestión gastrointestinal	103
1.2. Identificación de péptidos con afinidad al hierro derivados de proteínas de suero	108
1.2.1. Identificación de péptidos de suero lácteo en los hidrolizados y en las fracciones con afinidad al hierro mediante RP-HPLC-MS/MS	109
1.2.2. Perfil aminoacídico de los hidrolizados y de las fracciones con afinidad al hierro	116
2. Péptidos con actividad protectora sobre el epitelio gastrointestinal	120
2.1. Péptidos derivados de caseínas que favorecen la secreción de mucinas	120
2.1.1. Caracterización peptidómica del hidrolizado de caseínas lácteas mediante RP-HPLC-MS/MS	121
2.1.2. Efecto de los péptidos sintéticos sobre la expresión de MUC5AC y la secreción de mucinas en células HT29-MTX	123
2.1.3. Determinación de la estabilidad de los péptidos en el modelo celular HT29-MTX	126
2.1.4. Efecto del hidrolizado de caseína en la expresión de MUC5AC y la secreción de mucinas en células HT29-MTX	128
2.2. Actividad antiulcerogénica de hidrolizados de proteínas lácteas	132

2.2.1. Caracterización peptidómica de los hidrolizados de caseína y de proteína de suero enriquecido en β -Lg	132
2.2.2. Evaluación de la actividad antiulcerogénica	134
2.2.3. Evaluación de la contribución de los grupos sulfidrilo a la actividad antiulcerogénica	139
2.3. Papel protector del inhibidor de Bowman-Birk en la digestión de la lunasina	144
2.3.1. Caracterización de la lunasina y el IBBI activo e inactivo	144
2.3.2. Efecto de la digestión gástrica sobre la lunasina	145
2.3.3. Efecto de las enzimas pancreáticas sobre la lunasina	155
2.3.4. Efecto de los digeridos sobre la viabilidad de células de cáncer de colon	158
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	167
ANEXOS	200

ABSTRACT

In this Thesis, the production and identification of food peptides by using enzymatic hydrolysis and several effects on the gastrointestinal health have been studied. Peptide identification and quantification was performed by reversed phase-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS). Different hydrolysates and simulated gastrointestinal digests from casein, whey proteins and lunasin were analyzed. Initially, it was proposed the production of caseinphosphopeptides (CPPs) by tryptic hydrolysis of a casein-derived by-product generated during the manufacture of a functional ingredient with antihypertensive activity. Identification and semi-quantification of peptides revealed some qualitative and quantitative changes in the CPPs generated under different hydrolysis conditions and selective precipitation. The by-product was also subjected to gastrointestinal digestion simulating physiological conditions. Comparison of the resulting peptides obtained by these two hydrolysis processes showed an important sequence homology in the fraction of CPPs. Some regions, specifically α_{S1} -casein (43-59), (60-74), β -casein (1-25) and (30-50), were able to resist both tryptic hydrolysis and simulated digestion. Therefore, it is proved that the casein-derived by-product can be used as a source of CPPs to enhance the absorption of minerals at intestinal level.

In the same line, it was proposed the revalorization of protein subproducts, such as cheese whey, to obtain ingredients that promote mineral absorption. For this purpose, the characterization and identification of peptides derived from whey proteins with iron binding capacity was performed. A whey protein isolate was hydrolysed with food grade enzymes, Alcalase[®], pancreatin and Flavourzyme[®]. Hydrolyzates were subjected to iron (III)-immobilized metal ion affinity chromatography [IMAC-Fe (III)] and the bound peptides were sequenced by RP-HPLC-MS/MS. Regardless the enzyme used, the domains

(42-59) and (125-137) from β -lactoglobulin enclosed most of identified peptides. Iron-bound peptides exhibited common structural characteristics, such as, the abundance of iron-chelating amino acids (Asp, Glu and Pro). The total number of peptides identified in IMAC-Fe (III) fractions was substantially higher for Flavourzyme[®] than for pancreatin and pancreatin and Alcalase[®] treatments.

The epithelium of the gastrointestinal tract constitutes a large surface of contact between the external environment and the body, being continuously exposed to food digests, toxins, pathogens and changing luminal conditions, such as, pH changes or the action of proteolytic enzymes. Therefore, the strengthening of gastrointestinal mucus could be very beneficial in protecting this epithelium. In this context, the effect on mucin production in human intestinal goblet cells HT29-MTX of several food peptides, α_{s1} -casein ⁹⁰RYLGY⁹⁴, ¹⁴³AYFYPEL¹⁴⁹, ¹⁴⁴YFYPEL¹⁴⁹, and α_{s2} -casein ⁸⁹YQKFPQY⁹⁵, and a casein hydrolysate was evaluated. The sequences AYFYPEL and YFYPEL, significantly increased expression of MUC5AC, the major secreted mucin gene in this cell line, over 1.7-fold basal level after 4 h of exposure. Moreover, the casein hydrolysate containing these sequences showed a higher effect on mucin secretion than that of the peptides AYFYPEL and YFYPEL (210% vs. 160% of the control, respectively). Therefore, it is likely that other peptides or components in the hydrolysate could also contribute to the synthesis of mucins. Subsequently, the *in vivo* antiulcerogenic activity of this casein hydrolysate and a whey protein hydrolysate, compared to the precursor unhydrolyzed casein was evaluated. All tested samples significantly reduced the ulcerative lesions compared with the saline solution, for the doses of 300 and 1000 mg/kg body weight. A dose-response relationship was found for both hydrolysates. In addition, it was found that the antiulcerogenic activity of the whey protein hydrolysate was mediated by the action of

active sulfhydryl groups, since the protective effect decreased by treating the animal with a blocking agent of sulfhydryl groups.

Finally, the behavior of lunasin under conditions simulating the transit through the gastrointestinal tract in the absence or presence of soybean Bowman-Birk isoinhibitor 1 (IBB1) in both active and inactive states has been studied. Protection against the action of pepsin was independent of the amount of IBB1 present in the analyzed samples, whereas an IBB1 dose-dependent protective effect against trypsin and chymotrypsin was observed. The remaining lunasin and IBB1 as well as their derived peptides could be responsible for the anti-proliferative activity against colon cancer cells observed for the digests at the end of simulated gastrointestinal digestion.

The enzymatic hydrolysis allowed to obtain a wide range of food peptides capable of exert different physiological functions, including the enhancement of mineral absorption and the protection of the gut epithelium. The application of peptidomics was found to be a very useful tool for the identification and characterization of peptides present in various food matrices or after the gastrointestinal digestion.

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral, se estudió la obtención e identificación de péptidos alimentarios mediante el uso de hidrólisis enzimática y sus efectos sobre la salud gastrointestinal. La secuenciación y cuantificación de los péptidos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa acoplada a espectrometría de masas en tándem (RP-HPLC-MS/MS). Se analizaron distintos hidrolizados y digeridos gastrointestinales de caseínas, proteínas de suero de leche y lunasina. Inicialmente, se propone la producción de caseinofosfopéptidos (CPPs) mediante la hidrólisis con tripsina de un subproducto de caseína generado durante la fabricación de un ingrediente funcional con actividad antihipertensiva. La identificación y la semi-cuantificación de CPPs revelaron algunos cambios cualitativos y cuantitativos en los CPPs generados en los hidrolizados con distintas condiciones de tiempo de hidrólisis y precipitación selectiva. Una vez realizada la identificación de CPPs en los hidrolizados trípticos, el subproducto también se sometió a un proceso de digestión gastrointestinal simulando las condiciones fisiológicas. La comparación de los péptidos resultantes mostró gran homología en las secuencias de CPPs formados por la hidrólisis con tripsina y la digestión gastrointestinal simulada. Se observó que algunas regiones de α_{s1} -caseína, concretamente las comprendidas entre los residuos (43-59) y (60-74), de la α_{s1} -caseína y los residuos (1-25) y (30-50) de β -caseína, fueron capaces de resistir tanto a la hidrólisis con tripsina como a la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, se demuestra que el subproducto industrial puede ser empleado como fuente de CPPs para favorecer la absorción de minerales a nivel intestinal.

En la misma línea, de reutilización de subproductos de naturaleza proteica para la obtención de ingredientes que favorezcan la absorción de minerales, se propuso la

identificación de péptidos derivados de proteínas de suero lácteo con capacidad de unión a hierro. Para ello, se prepararon hidrolizados de las proteínas del suero lácteo con enzimas de grado alimentario, Alcalasa[®], pancreatina y Flavourzyme[®]. Los hidrolizados se sometieron a cromatografía de afinidad por iones metálicos Fe (III) inmovilizado [IMAC-Fe (III)], y los péptidos unidos se secuenciaron mediante RP-HPLC-MS/MS. Se observó que independientemente de la enzima utilizada, los dominios de β -Lg, (42-59) y (125-137), englobaron la mayoría de los péptidos identificados. De manera general, los péptidos unidos a hierro mostraron características estructurales comunes, tales como la abundancia de los aminoácidos (Asp, Glu y Pro). Cabe destacar que el número de péptidos identificados fue apreciablemente mayor en los tratamientos con Flavourzyme[®] que en los obtenidos con pancreatina o Alcalasa[®].

El epitelio del tracto gastrointestinal constituye la mayor superficie de contacto entre el medio externo y el organismo, estando continuamente expuesto a diversas agresiones, como patógenos y compuestos nocivos. Por tanto, la fortificación del mucus gastrointestinal podría ser muy beneficiosa en la protección del epitelio. En este contexto, se evaluó el efecto sobre la producción de mucinas, en células caliciformes intestinales humanas HT29-MTX, de los fragmentos de α_{s1} -caseína ⁹⁰RYLG⁹⁴, ¹⁴³AYFYPEL¹⁴⁹, ¹⁴⁴YFYPEL¹⁴⁹, y de α_{s2} -caseína ⁸⁹YQKFPQY⁹⁵ y del hidrolizado de caseína que los contiene. De los fragmentos ensayados, las secuencias AYFYPEL e YFYPEL aumentaron significativamente la expresión del gen de MUC5AC en las células HT29-MTX, logrando incrementos similares y cercanos a 1.7 veces la expresión basal después de 4 horas de exposición. Sin embargo, el hidrolizado de caseína mostró un mayor efecto sobre la secreción de mucinas (210% de los controles) que los péptidos AYFYPEL e YFYPEL cuando se usaron individualmente (alrededor del 160%). Por tanto, es probable que otros péptidos o componentes presentes en el hidrolizado contribuyan en la síntesis de mucinas.

Posteriormente, se evaluó la actividad antiulcerogénica *in vivo* del hidrolizado de caseína y de un hidrolizado de proteínas de suero, en comparación con la de la caseína de partida empleando un modelo de úlceras inducidas por etanol absoluto en ratas. Todas las muestras ensayadas a las dosis de 300 y 100 mg/kg ejercieron un efecto protector frente a la aparición de lesiones ulcerativas producidas por etanol, en comparación con la solución salina utilizada como control. Además, se encontró un efecto dosis dependiente para ambos hidrolizados enzimáticos. Por otro lado, se encontró que la actividad antiulcerogénica del hidrolizado de proteínas de suero estaba mediada por la acción de los grupos sulfhidrilos, ya que el efecto protector del hidrolizado disminuyó al tratar el animal con un agente bloqueante de los grupos sulfidrilo.

Finalmente, se ha estudiado el comportamiento de la lunasina en condiciones que simulan el tránsito a través del tracto gastrointestinal en ausencia o presencia del isoinhibidor Bowman-Birk (IBB1) en estado activo e inactivo. La protección contra la acción de la pepsina fue independiente de la cantidad de IBB1 presente en las muestras analizadas, sin embargo se observó un efecto protector dependiente de la dosis IBB1 contra la tripsina y la quimotripsina. La lunasina restante y el IBB1, así como sus péptidos derivados podrían ser responsables de la actividad anti-proliferativa contra células de cáncer de colon observados en los digeridos obtenidos al final de la digestión gastrointestinal simulada.

La hidrólisis enzimática permitió obtener una amplia gama de péptidos alimentarios capaces de ejercer diversas funciones fisiológicas, así como la protección del epitelio y el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. La aplicación de la peptidómica, resultó una herramienta muy útil para la identificación y caracterización de péptidos presentes en las diversas matrices alimentarias o tras la digestión gastrointestinal.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -La: α -Lactoalbúmina

ANOVA: Análisis de varianza

β -CN: β -caseína

β -Lg: β -Lactoglobulina

BAPNA: N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida

BTEE: Éster etílico de N-benzoil-L-tirosina

CN: Caseína

CPPs: Caseinfosfopéptidos

C-terminal: Carboxilo terminal

DTT: DL-ditiotreitol

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

ELISA: Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima

ELLA: Ensayo de lectina asociado a enzimas

IBB1: Isoinhibidor de soja Bowman-Birk tipo 1

IC₅₀: Concentración necesaria de un compuesto para inhibir el 50% de la actividad

ICP: Plasma de acoplamiento inductivo

ILU: Índice de lesiones ulcerativas

IMAC-Fe-III: Cromatografía de afinidad con hierro inmovilizado

KTI: Inhibidor de tripsina de Kunitz

MALDI-TOF: Desorción/ionización de la matriz mediante láser con acoplamiento a un detector de tiempo de vuelo

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MTT: Bromuro de (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio

MTX: Metotrexato

Mucn: Gen correspondiente a la mucina de rata número “n”

MUCn: Gen correspondiente a la mucina humana número “n”

NEM: N-etilmaleimida NEM

NO: Óxido nítrico

N-terminal: Amino-terminal

OPD: O-fenil endiamina dihidrocloruro

PBS: Tampón fosfato salino

PGs: Prostaglandinas

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a tiempo real

RP-HPLC-MS/MS: Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa acoplada a espectrometría de masas en tándem

TFA: Ácido trifluoroacético

WPC: Concentrado de proteínas de suero

WPH: Hidrolizado de proteínas de suero

WPI: Aislado de proteínas de suero

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

La deficiencia de minerales es uno de los problemas nutricionales más importantes en todo el mundo, donde la deficiencia de hierro suele ser la más común (FAO/OMS, 2002). Se ha demostrado que algunos péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas lácteas producen efectos positivos en la estabilidad, absorción y biodisponibilidad de minerales divalentes como el hierro, calcio, magnesio y zinc, ya que tienen la capacidad de formar complejos solubles (Bouhallab y col., 2002). En este contexto, la administración de minerales en forma de complejos se considera una excelente alternativa para mitigar los problemas relacionados con su deficiencia (Wang y col., 2014). En el caso específico del hierro, la suplementación con diferentes sales ferrosas, ha mostrado baja biodisponibilidad, alteraciones gastrointestinales y características sensoriales negativas (Schumann y col., 2007). En cambio, la suplementación en forma de complejo ha mostrado características positivas, como una mejor biodisponibilidad y baja incidencia de efectos secundarios (Eisenstadt y col., 2013).

Además de mejorar la absorción de determinados nutrientes, los péptidos alimentarios con efectos fisiológicos a nivel gastrointestinal pueden modular las funciones de las células epiteliales intestinales (Shimizu y Son, 2007). El tracto gastrointestinal constituye la principal superficie de intercambio y comunicación entre el medio externo y el medio interno, estando continuamente expuesto a diversas agresiones, como patógenos y compuestos nocivos. En este sentido, el epitelio intestinal desempeña funciones protectoras tanto desde el punto de vista físico (barrera física a determinadas moléculas y patógenos), como biológica (p.e. determinadas actividades enzimática, secreción de anticuerpos, etc.) (Shimizu, 2010).

En esta Tesis se planteó el estudio de péptidos lácteos que favorecen la absorción de minerales y péptidos que modulan la secreción de mucinas intestinales. Por otra parte, se ha evaluado la resistencia a la digestión gastrointestinal de un péptido bioactivo de soja.

Objetivo general:

Obtención e identificación de péptidos alimentarios mediante el uso de hidrólisis enzimática que favorecen la absorción de minerales y protegen la mucosa gastrointestinal.

Para llevar a cabo este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales y se desarrolló el siguiente plan de trabajo:

Objetivo 1. Obtención de péptidos con capacidad de unión a minerales a partir de subproductos de la industria láctea.

1.1. Obtención de caseinfosfopéptidos (CPPs) mediante hidrólisis con tripsina y tras la simulación de la digestión gastrointestinal de un subproducto derivado de caseína.

- Preparación de un hidrolizado trípico de grado alimentario a partir de un subproducto de caseína.
- Simulación de la digestión gastrointestinal del subproducto de caseína.
- Precipitación selectiva para el aislamiento de los CPPs obtenidos de la hidrólisis con tripsina y de la simulación de la digestión.
- Identificación y semi-cuantificación de CPPs generados en los hidrolizados trípticos y en digeridos gastrointestinales del subproducto mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).
- Comparación del perfil peptídico obtenido en la hidrólisis enzimática y tras la simulación de la digestión gastrointestinal del subproducto.

1.2. Identificación de péptidos con capacidad de unión a hierro obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas de suero lácteo.

- Hidrolisis de las proteínas del suero lácteo con enzimas de grado alimentario, Alcalasa[®], pancreatina y Flavourzyme[®].
- Fraccionamiento de los hidrolizados mediante ultrafiltración.
- Aislamiento de péptidos con afinidad al hierro mediante el uso de cromatografía de afinidad con hierro inmovilizado (IMAC-Fe-III).
- Identificación de péptidos con afinidad al hierro mediante RP-HPLC-MS/MS.
- Evaluación del perfil de aminoácidos de los hidrolizados mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Objetivo 2. Estudio de hidrolizados y péptidos de origen alimentario con efecto protector a nivel gastrointestinal.

Para llevar a cabo este objetivo se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

2.1. Evaluación del efecto sobre la expresión génica y secreción de mucinas en células intestinales humanas de un hidrolizado de caseína y péptidos derivados.

- Preparación un hidrolizado de caseína con pepsina de grado alimentario y síntesis química de péptidos.
- Identificación y cuantificación de una selección de péptidos de α_{s1} -caseína ⁹⁰RYLGY⁹⁴, ¹⁴³AYFYPEL¹⁴⁹, ¹⁴⁴YFYPEL¹⁴⁹, y de α_{s2} -caseína ⁸⁹YQKFPQY⁹⁵ mediante HPLC-MS/MS.
- Evaluación del efecto sobre la expresión del gen MUC5AC y secreción de mucinas, en células caliciformes intestinales humanas HT29-MTX de los péptidos seleccionados y del hidrolizado de caseína que los contiene.

- Evaluación de la estabilidad de los péptidos en contacto con las células epiteliales intestinales humanas.

2.2. Evaluación de la actividad antiulcerogénica in vivo de hidrolizados de caseína y proteínas de suero lácteo.

- Preparación de los hidrolizados de caseínas y proteínas de suero con enzimas de grado alimentario (pepsina y tripsina, respectivamente).
- Determinación de la actividad antiulcerogénica del hidrolizado de caseína con pepsina, caseína sin hidrolizar y un hidrolizado trípico de proteínas de suero, empleando un modelo de úlceras inducidas por etanol absoluto en ratas Wistar.
- Estudio de la contribución de grupos sulfhidrilo activos en las propiedades antiulcerogénicas observadas.

2.3. Estudio del efecto protector del inhibidor de proteasas Bowman-Birk en la digestión de lunasina, y evaluación de la actividad de los digeridos sobre viabilidad de células de cáncer de colon.

- Aislamiento e inactivación del iso inhibidor-1 de Bowman-Birk mediante reducción de puentes disulfuro y alquilación. Síntesis química de lunasina.
- Simulación de la digestión gastrointestinal de lunasina en ausencia o presencia del iso inhibidor Bowman-Birk (IBB1) en estado activo e inactivo.
- Identificación y cuantificación de la lunasina, IBB1 y péptidos derivados resistentes a la simulación de la digestión mediante RP-HPLC-MS/MS.
- Evaluación de la viabilidad de células HT-29 y Caco-2 en presencia de los digeridos gastrointestinales de lunasina.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Proteínas lácteas y proteínas de soja

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo, incluida la catálisis de reacciones metabólicas, el transporte de vitaminas, minerales, oxígeno y combustibles. Constituyen la estructura de los tejidos, la transmisión nerviosa, la contracción muscular, la motilidad celular, la coagulación de la sangre, la defensa inmunitaria, también funcionan como hormonas y moléculas reguladoras. Están formadas por cadenas de aminoácidos que se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo α -amino, con pérdida de agua. La secuencia de aminoácidos que componen una proteína constituye su estructura primaria, de vital importancia desde el punto de vista nutricional (Baynes y Dominiczak, 2011).

La dieta es uno de los factores ambientales que influyen en nuestra salud y el desarrollo de ciertas enfermedades. Entre los diferentes componentes de los alimentos, las proteínas constituyen uno de los nutrientes más importantes. De hecho, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (FAO/OMS, 2003) han recomendado un consumo diario de 0,8 a 1 gramo de proteína por cada kilo de peso para una persona adulta sana.

Las proteínas lácteas son conocidas por su alto valor biológico, debido a su alto contenido en aminoácidos esenciales y a su adecuada digestibilidad. En la leche bovina se encuentran en una proporción entre 30-35 g/L. Se dividen en dos grupos: las caseínas, que son el principal componente proteico de la leche, constituyen el 80% del total de las proteínas, y el 20% restante lo constituyen, las proteínas del suero de leche (**Tabla 1**). Además de poseer un elevado valor nutricional la fracción proteica de la leche es

precursora de numerosos péptidos biológicamente activos. En las últimas décadas, el estudio y caracterización de los péptidos bioactivos, derivados de las proteínas de la leche han ganado un creciente interés científico y comercial como fuente de moléculas biológicamente activas que pueden ofrecer distintos beneficios a la salud. Estas biomoléculas se encuentran tanto en las fracciones de caseína como en la proteína de suero de donde pueden ser aisladas y purificadas.

Tabla 1. Concentración de las proteínas de la leche (Walstra y Jenness, 1984).

Proteína	Concentración en la leche (g/L)	Porcentaje de la proteína respecto a la concentración total (p/p)
PROTEÍNA TOTAL	33.0	100.0
CASEINAS	26.0	79.5
α_{s1} -caseína	10.0	30.6
α_{s2} -caseína	2.6	8.0
β -caseína	9.3	28.4
k-caseína	3.3	10.1
γ -caseína	0.8	2.4
PROTEÍNAS DEL SUERO	6.3	19.3
β -lactoglobulina	3.2	9.8
α -lactoalbúmina	1.2	3.7
Inmunoglobulinas	0.7	2.1
Seroalbúmina	0.4	1.2
Varias (Proteosa-peptona)	0.8	2.4
PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA DEL GLOBULO GRASO	0.4	1.2

1.1. Caseínas

Las caseínas son las principales proteínas de la leche, representan alrededor del 80% del total de proteínas, se definen como fosfoproteínas que precipitan a pH 4,6 a 20°C. Bajo la denominación de caseínas se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas, α_{s1} caseína,

α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína y a su vez, cada una de estas proteínas posee diferentes variantes genéticas que son el resultado de la sustitución de algunos aminoácidos dentro de la secuencia proteica (Farrell y col., 2004). Las caseínas son proteínas complejas y muy diferentes a otras proteínas, debido al alto contenido de prolina y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina. Asimismo, la estructura secundaria de las caseínas está poco organizada y es similar a la de las proteínas globulares desnaturalizadas (Walstra y Jenness, 1984). Debido a su diferente distribución de cargas e hidrofobicidad las caseínas se unen entre sí y se asocian a sales inorgánicas, principalmente calcio y fosfato, para formar unidades o agregados coloidales llamadas micelas, que proporcionan a la leche su opalescencia característica (Qi, 2007).

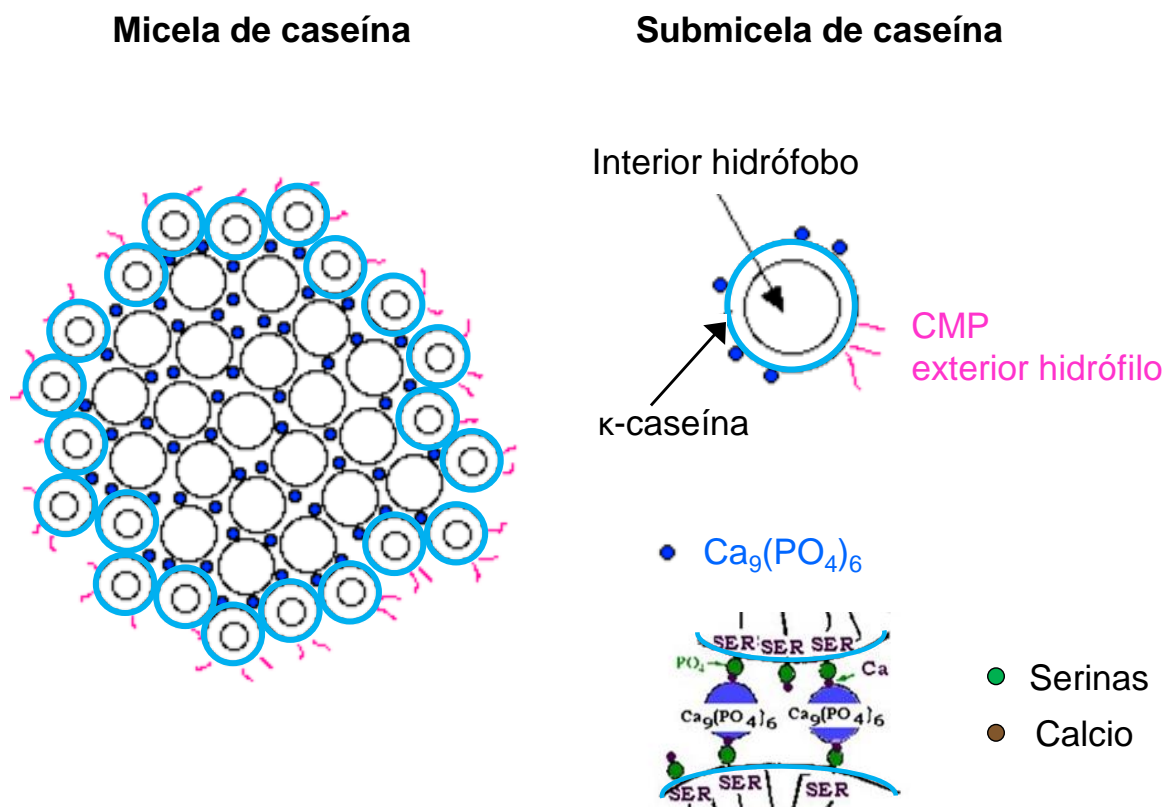


Figura 1. Esquema de la estructura micelar de las caseínas bovinas. Adaptada de Farrell y col., (2004).

1.1.1. α_{S1} -caseína

Es la fosfoproteína más abundante en la leche bovina (12-15 g/L) y constituye hasta el 45 % de la fracción de caseína. Consta de 9 variantes genéticas designadas como A, B, C, D, E, F, G, H e I. La variante de referencia es la B que presenta dos subvariantes, con 8 y 9 grupos fosfatos. La α_{S1} -CN, es una proteína monomérica y se compone de 199 residuos de aminoácidos sin cisteína. El peso molecular calculado es de 23,615 kDa. Se distinguen tres zonas claramente hidrofóbicas, f(1-44), f(90-113) y f(132-199) y un dominio de alta polaridad situado en el segmento f(41-80), en el que se encuentra la mayor parte de la carga de la proteína (Swaisgood, 1992; Farell y col., 2004). Tiene un alto contenido de residuos de prolina distribuidos a lo largo de la molécula. Debido a esto no presenta una estructura terciaria definida sino una estructura abierta y flexible con cantidades significativas de estructura secundaria (Farell y col., 2004). Esta característica la hace muy susceptible a la hidrólisis por la acción de las proteasas y peptidasas durante la digestión gastrointestinal (Astwood y col., 1996).

1.1.2. β -caseína

Constituye un 35% de la fracción de caseína. Contiene 12 variantes genéticas designadas como A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 e I, siendo la variante de referencia la A2 con cinco grupos fosfatos. Es una proteína monomérica y se compone de 209 residuos de aminoácidos, sin residuos de cisteína, con un peso molecular de 23,983 kDa. Es la más hidrófoba de todas las caseínas y en su estructura presenta una clara división en dos zonas. La que corresponde al extremo C-terminal es particularmente hidrófoba, mientras que los aminoácidos más hidrófila, y todos los grupos fosfato unidos a serinas, se concentran en el extremo N-terminal. Esta separación de la molécula en dos dominios de

diferente hidrofobicidad hace que esta proteína sea altamente anfipática (Farell y col., 2004).

1.1.3. α_{S2} -caseína

Constituye el 10% de la fracción de caseína la leche bovina, contiene cuatro variantes genéticas designadas como A, B, C y D, siendo la variante de referencia la A con 11 grupos fosfatos. La α_{S2} -CN es un polipéptido de una sola cadena y se compone de 207 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 25,226 kDa. Con un enlace disulfuro interno entre los residuos de cisteína en posición 36 y 40 y es la más hidrófila de todas las caseínas. Es una proteína caracterizada por tener diferentes dominios con altas cargas netas, lo que le hace fuertemente sensible a la acción del calcio y de otros cationes (Farell y col., 2004).

1.1.4. κ -caseína

En la leche bovina constituye el 10% de las caseínas y tiene una estructura distinta de la de las otras caseínas. Formada por 169 aminoácidos, es la única caseína que tiene hasta cinco cadenas glicosídicas unidas a los residuos de treonina o serina. Existen dos dominios claramente diferenciados, el segmento N-terminal hidrófobo y con carga neta positiva y el extremo C-terminal, de alto carácter hidrófilo y carga negativa, con un peso molecular de 19,037 kDa (Farell y col., 2004).

1.2. Proteínas de suero

Son un conjunto de proteínas que permanecen en la fase líquida tras la precipitación de las caseínas a pH 4,6 y 20°C. La concentración de las proteínas del suero en la leche bovina oscila entre 5-6 g/L. Se consideran proteínas séricas mayoritarias, la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, la seroalbúmina, las inmunoglobulinas y la fracción

proteosa-peptona (Farrell y col., 2004). Las proteínas séricas minoritarias incluyen la lactoferrina, el caseinomacropéptido que se libera de la κ -CN en la primera etapa de la producción del queso y enzimas como la plasmina y lactoperoxidasa (Walstra y Jenness, 1984). A diferencia de las caseínas, presentan una estructura terciaria globular y compacta estabilizada por puentes disulfuro entre cisteínas, lo que las hace menos susceptibles a la hidrólisis (Pihlanto y Korhonen, 2003).

1.2.1. β -Lactoglobulina

Es una proteína globular que representa alrededor del 60% del total de las proteínas de suero de leche bovina (Law y col., 1993), su concentración oscila entre 2,3 y 4,9 g/L. Está formada por una cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 18 kDa, con un radio hidrodinámico de aproximadamente 2 nm, que contiene dos puentes disulfuro y un tiol libre (Hambling y col., 1992). De acuerdo a su estructura se incluye en la familia de las lipocalinas y presenta gran capacidad para unirse a una variedad de pequeñas moléculas hidrófobas, tales como el retinol, los lípidos y los ácidos grasos (Mónaco y col., 1987; Pérez y col., 2014).

1.2.2. α -Lactoalbúmina

En la leche bovina representa el 25% de las proteínas del suero, en una concentración de aproximadamente 1,2 a 1,5 g/L. La α -La bovina es una proteína globular de peso molecular aproximado de 14,4 kDa. Está constituida por una cadena de 123 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro, sin ningún grupo tiol libre. En su estructura nativa posee dos dominios; uno formado por una gran α hélice y otro por una pequeña hoja en β , estos se unen por un puente de cisteína entre los residuos 73 y 91. Otro puente disulfuro conecta los dos dominios en los residuos 61-77. Presenta una alta afinidad por iones metálicos como

magnesio (Mg), manganeso (Mn), potasio (K), sodio (Na), hierro (Fe) y especialmente calcio (Ca) (Chatterton y col., 2006; Kamau y col., 2010). Presenta tres variantes genéticas A, B y C, siendo la variante B la más común (Eigel y col., 1984). Su configuración es estable a valores de pH entre 5,4 y 9,0 y presenta mayor resistencia al calor que la β -Lg, debido en parte a que la desnaturalización es reversible si la temperatura es inferior a los 75 °C (Law y col., 1994).

1.2.3. Seroalbúmina

Es una proteína de gran tamaño con un adecuado perfil de aminoácidos esenciales. Representa aproximadamente el 1,5 % del total de proteínas de la leche y aproximadamente el 6% de la proteína total del suero (0,4 g/L). Consiste en una cadena de 583 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 66.399 Da. Contiene 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre (Hirayama y col., 1990; Farell y col., 2004). Se han encontrado estructuras como monómero y como dímero, pero polimerizaciones de mayor grado no parecen comunes (Janatova y col., 1968). Es una proteína de baja estabilidad térmica, por lo que se desnaturaliza fácilmente. Tiene tendencia a unirse a otras moléculas, principalmente a ácidos grasos (Peters, 1995), lo que le sirve de protección frente al ataque enzimático y a la desnaturalización térmica (Riera y col., 1996).

1.2.4. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas representan aproximadamente el 1% del total de las proteínas de la leche y su concentración es de 0,6 g/L en el suero y diez veces mayor en el calostro. Existen cinco clases o isotipos de inmunoglobulinas, Ig G, Ig M, Ig A, Ig D e Ig E, de las cuales la Ig G es la mayoritaria, representando el 80% del total de las Ig presentes en la leche. Todas las Igs presentan una estructura similar, compuesta por cuatro subunidades de

peso molecular próximo a los 160 kDa y unidas por puentes disulfuro (Butler, 1974). Su actividad como anticuerpos favorece la transferencia de inmunidad pasiva al neonato (Larson y col., 1980, Farell y col. 2004).

1.2.5. Lactoferrina

Es una glicoproteína presente en la mayoría de los fluidos biológicos de los mamíferos, incluyendo la leche, la saliva y las secreciones mucosas. Formada por una sola cadena polipeptídica, consta de 689 aminoácidos, con un peso molecular próximo a los 80 kDa. La molécula presenta 17 puentes disulfuro y consta de dos lóbulos homólogos (Ribadeau-Dumas, 1993). Fija el hierro, por lo que puede desempeñar un importante papel en el control de la absorción de este mineral y en la selección de la flora intestinal del neonato (Sánchez y col., 1992). Además, actúa en el sistema de defensa del organismo frente a las infecciones bacterianas, debido a la formación de un complejo de la enzima con el tiocianato y el peróxido de hidrógeno (Wolfson y Summer, 1993).

1.3. Proteínas de soja

La soja (*Glycine max. (L.) Merrill*) es una leguminosa de gran valor que constituye una fuente importante de proteínas (40-50%). Se clasifican en cuatro categorías de proteínas de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación 2S, 7S, 11S y 15S. La β -conglucina (globulina 7S) y glicina (globulina 11S) constituyen hasta el 90% de la proteína de soja total (Gianazza y col., 2003). La β -conglucina con peso molecular de 150-250 kDa, es un trímero y/o hexámero en solución y se produce en ambas formas en la semilla. Contiene dos péptidos similares, α y α' (57 kDa), y un péptido β glucosilado (42 kDa) en un conjunto aleatorio de siete formas, $\alpha'\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\alpha'$, α_3 , β_3 . La glicina es un hexámero, con peso molecular de 300-400 kDa compuesto por péptidos

ácidos y básicos y puede disociarse en las formas 2S, 3S o 7S a diferentes condiciones de pH y fuerzas iónicas (Hammond y col., 2003).

La soja contiene dos principales inhibidores de proteasas, Kunitz (KTI) y Bowman-Birk (BBI), estos representan alrededor del 6% de la proteína total de la semilla (Brandon y Friedman, 2002). KTI es una proteína de 21 kDa con un único sitio reactivo que se une a la tripsina. El BBI es una proteína con masa molecular en el rango de 6-9 kDa, y en la soja son predominantes dos isoinhibidores, IBB1 y IBBD2, mostrando una divergencia considerable en la secuencia de aminoácidos dentro de sus dominios inhibitorios; la isoforma IBB1, inhibe la tripsina y la quimotripsina, mientras que la isoforma IBBD2 inhibe sólo la tripsina (Clemente y col., 2010). La gran capacidad de los componentes de la soja para prevenir o suprimir los procesos cancerígenos se ha demostrado en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*. Las sustancias bioactivas de la soja más estudiadas hasta ahora son las isoflavonas, el BBI, la lectina y la lunasina (Guijarro-Diez y col., 2014).

La lunasina es un péptido que se descubrió en la soja y corresponde a la subunidad de la albúmina 2S que está codificada en el gen Gm2S-1, que también codifica para una proteína rica en metionina, un péptido señal y un péptido de unión (Odani y col., 1987). Su secuencia es de 43 aminoácidos:

SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD y se caracteriza por la presencia de una estructura de hélice formada por arginina, glicina y ácido aspártico, fragmento (33-35) y por una secuencia continua de nueve residuos de ácido aspártico en el extremo C-terminal f(35-43). Un estudio de dinámica molecular destaca la importancia de este péptido por su α -helicidad y su carga negativa en el extremo C-terminal asociado con el reconocimiento y la unión con el residuo de la cromatina favoreciendo la actividad anti-mitótica de la lunasina en varias líneas celulares de mamíferos (Singh y Bisetty, 2012). Por

otra parte, la región de la lunasina (23-31) también se une a las histonas de la cromatina ya que comparte homología con la región conservada de proteínas de unión a la cromatina (Hernández-Ledesma y col., 2010). Sin embargo, no se conoce la funcionalidad de la región (1-22).

Después de identificarse en la soja, la lunasina también se ha observado en otras fuentes vegetales tales como la cebada, el centeno, el trigo y *Solanum nigrum* (Jeong y col., 2007a, c, 2009 y 2010). Este hecho ha incrementado el interés por la determinación cuantitativa de la lunasina. Los métodos analíticos principales empleados para este fin han sido el Western Blot (Jeong y col., 2002, 2003, 2007b,c, y 2010; Lam y col., 2003 y Hernández-Ledesma y col., 2009) y ELISA (Mejia y col., 2004, Dia y col., 2009 y 2013; Cavazos y col., 2012). Sin embargo, estos métodos requieren el uso de anticuerpos que sólo reconocen la región (23-39), EKHIMEKIQGRGDDDDDD y pueden sufrir reactividad cruzada con otros fragmentos proteicos. Recientemente, se ha empezado a utilizar la espectrometría de masas (MS), no sólo para la determinación sino para la cuantificación de lunasina. Así, Nakurte y col. (2012 y 2013) han desarrollado un método de LC-MS/MS que les ha permitido cuantificar lunasina en triticale (cereal híbrido que procede del cruzamiento entre trigo y centeno) y en avena. Guijarro-Díez, y col., (2014) han determinado el contenido en lunasina en diferentes productos de soja mediante un método de isoelectroenfoque bidimensional acoplado a cromatografía líquida con detección con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

2. Digestión de proteínas y péptidos alimentarios

La digestión gastrointestinal es un proceso complejo esencial para la salud de los seres vivos, debido a que la transformación de los alimentos ingeridos en elementos más simples proporciona nutrientes que se usan en el mantenimiento, crecimiento celular y/o como

fuelle de energíla. En ella ocurren dos procesos principales: la rotura mecánica del alimento para producir partículas más pequeñas y la hidrólisis enzimática en la que las macromoléculas se degradan a moléculas que pueden ser absorbidas por el organismo (Guerra y col., 2012). La absorción de los macro y micronutrientes, se desarrolla principalmente en el duodeno y el yeyuno superior (Langerholc y col., 2011).

Cada tramo del tracto gastrointestinal tiene su propia función en el proceso digestivo. En la cavidad oral se produce la masticación de los alimentos y se mezcla con la saliva, que contiene una compleja mezcla de componentes incluyendo la enzima amilasa que cataliza la hidrólisis del almidón en azúcares. El bolo alimenticio es transportado a través del esófago al estómago donde entra en contacto con proteasas, principalmente pepsina y lipasas, que hidrolizan proteínas y lípidos, respectivamente. La digestión *in vivo* de las proteínas comienza en el estómago bajo la acción de la pepsina, además la secreción de ácido a nivel gástrico disminuye el pH, lo que contribuye a la digestión de las proteínas. El quimo es gradualmente desplazado al intestino delgado donde el pH del estómago es neutralizado y se incorporan jugos digestivos pancreáticos (con enzimas digestivas como la tripsina y la quimotripsina) y de la vesícula biliar (ácidos biliares). Las enzimas digestivas secretadas catalizan la hidrólisis de las proteínas, los lípidos y el almidón, mientras que los ácidos biliares ayudan a emulsionar los productos resultantes de la digestión de los lípidos en micelas (Withney y Rolfes, 2008; Wickham y col., 2009). La etapa final en la digestión de las proteínas alimentarias y el almidón ocurre en la superficie de los enterocitos por la acción de las proteasas de las células intestinales con borde en cepillo (Shimizu, 2004). Estas enzimas incluyen maltasa, iso-maltasa, lactasa y distintas peptidasas que liberan aminoácidos o dipéptidos desde el extremo N- y C-terminal de los oligopéptidos (Kenny y Maroux, 1982; Yoshioka y col., 1987; Ericson y col., 1989). Los nutrientes liberados durante este proceso se absorben principalmente a nivel del yeyuno y en menor medida en

el íleon (Withney y Rolfes, 2008). Además, el proceso digestivo se completa gracias a la acción de la microbiota intestinal que contribuye a la digestión de los componentes alimentarios, incluyendo polisacáridos complejos que nos pueden ser digeridos por las enzimas gastrointestinales secretadas por el organismo (Flint, 2012).

En el caso de la leche y los productos lácteos, las proteínas presentan una digestibilidad alta en torno al 95% (Damodaran, 1997). La digestión de las proteínas lácteas comienza con la pepsina a nivel gástrico aunque se ha descrito la resistencia de ciertas proteínas a la acción de la pepsina como por ejemplo, la β -Lg que llegaría sin hidrolizar al intestino delgado cuando la proteína se encuentra en estado nativo (Guo y col., 1995). Asimismo, se ha estudiado la susceptibilidad de las proteínas lácteas a las enzimas duodenales. Así, Mandalari y col., (2009) realizaron la digestión de β -CN con pancreatina sin etapa gástrica previa, y Jakobsson y col., (1982) lo llevaron a cabo con fluido duodenal humano. La fracción de α _S-CN también se digiere fácilmente por las enzimas duodenales (Fu y col., 2002). La digestión gástrica de la β -CN seguida de una etapa duodenal ha sido estudiada por diferentes autores como Macierzanka y col., (2009), Mandalari y col., (2009) y Dupont y col., (2010 a y b). A pesar del uso de diferentes matrices, pH y concentraciones de enzimas en los estudios mencionados, no se ha detectado β -CN intacta al final de la digestión gastrointestinal en ninguno de ellos.

A pesar de la elevada digestibilidad de las proteínas lácteas, las regiones fosforiladas de las proteínas lácteas presentan resistencia a la hidrólisis por acción de las enzimas gastrointestinales. De hecho, *in vivo* se ha demostrado la liberación de regiones fosforiladas que se acumularían a nivel del intestino delgado donde tiene lugar la absorción de los minerales (Meisel y Frister, 1988; Chabance y col., 1998). Las secuencias peptídicas fosforiladas son las responsables, al pH del intestino, de la unión de Ca^{2+} , Zn^{2+} , y Mg^{2+} . Se ha descrito la especial resistencia del complejo formado a las proteasas gastrointestinales *in*

vivo (Mellander y Folsch., 1972). Por ejemplo, el péptido β -CN f(15-25)4P unido al hierro no sufre apenas hidrólisis durante la digestión, sugiriendo que los complejos formados con los iones de hierro inhiben la acción tanto de la fosfatasa como de las peptidasas (Boutrou y col., 2010). Además, se ha propuesto que la actividad fosfatasa alcalina localizada en el borde en cepillo de la membrana apical de los enterocitos podría favorecer la absorción del hierro unido a estas regiones fosforiladas, promoviendo la desfosforilación y por tanto, la liberación del hierro.

Por lo tanto, durante la digestión de los alimentos se van a generar una variedad ingente de secuencias peptídicas. Algunos de estos péptidos liberados durante la digestión pueden presentar homología estructural con péptidos endógenos y podrían interactuar con las mismas dianas. En otros casos, estos péptidos pueden actuar como inhibidores de enzimas endógenas o actuar sobre distintos receptores en el organismo, pudiendo, así ejercer una determinada actividad biológica. Estas secuencias peptídicas capaces de ejercer un determinado efecto o actividad biológica en el organismo se conocen con el nombre de péptidos bioactivos. Éstos pueden encontrarse en una forma inactiva o menos activa dentro de la matriz proteica siendo necesaria su hidrólisis, por ejemplo durante la digestión gastrointestinal, para su liberación y activación. Estas secuencias también pueden generarse mediante hidrólisis *in vitro*, o una combinación de ambos (Hernández-Ledesma y col., 2013). Por otro lado, el proceso de digestión no sólo determina la formación de péptidos que pueden ser fisiológicamente y metabólicamente relevantes, incluyendo la liberación de epítomos potencialmente involucrados en las alergias, sino que también es relevante para la formulación de nuevos alimentos, en cuanto a sus aspectos tecnológicos, toxicológicos y nutricionales (Wickham y col., 2009).

Asimismo, cuando se estudia el efecto que un compuesto activo podría tener en nuestro organismo, es importante asegurarse que la forma activa alcance el órgano diana.

Con este fin, se debe evaluar la estabilidad a la digestión, su absorción, y también es importante evaluar su distribución, metabolismo y excreción, a fin de establecer las propiedades de biodisponibilidad del péptido de interés (Foltz y col., 2010).

Los modelos de digestión *in vitro* se han desarrollado como una alternativa adecuada y reproducible a los estudios *in vivo* para mimetizar los mecanismos complejos de la digestión. La simulación de lo que acontece en el tracto gastrointestinal supone establecer unos parámetros, lo más próximos posibles a las condiciones fisiológicas de pH y tiempos de tránsito para cada sistema, así como las condiciones químicas y enzimáticas para cada tiempo. Una regla básica en la simulación gastrointestinal es conseguir la relación adecuada de complejidad técnica frente a la relevancia fisiológica, ya que siempre existirán parámetros que quedarán fuera del modelo entre otros: mecanismos hormonales, sistema inmune, microbiota, etc. Los modelos de simulación gastrointestinal pueden clasificarse en estáticos y dinámicos, siendo estos últimos los más complejos ya que simulan cambios tanto físicos, como vaciado gástrico, absorción de nutrientes, movimientos peristálticos, como cambios químicos, modificación del pH y empleo de secreciones a lo largo del tiempo de digestión.

3. Péptidos con actividad sobre la función intestinal

El intestino es el órgano responsable de la absorción de nutrientes, ejerce funciones de barrera, de reconocimiento de señales, y de síntesis de compuestos bioactivos. Estas funciones están reguladas por las hormonas y citoquinas, pero se sabe que los componentes de la dieta también pueden desempeñar un papel fundamental como moduladores de las funciones intestinales. Las células epiteliales intestinales, que se encuentran formando una monocapa que cubre toda la superficie del tracto gastrointestinal, son especialmente importantes en esta modulación porque están directamente en contacto con el contenido

intestinal, incluyendo los alimentos, sus digeridos y la flora bacteriana. Por lo tanto el alimento no puede ser considerado como una mera fuente de nutrientes sino que, además, puede actuar como “modulador” de funciones fisiológicas a nivel intestinal. La modulación de las funciones intestinales mediante la dieta ha sido calificada como esencial para mejorar la salud humana (Shimizu, 2004 y 2010). Shimizu y Son (2007) han clasificado los péptidos alimentarios moduladores de la función intestinal en dos categorías: (i) aquéllos que ejercen su actividad en el tracto intestinal, regulando la absorción de nutrientes, y (ii) los que modulan las funciones de las células epiteliales, como los que pueden prevenir o reparar el daño celular causado por el estrés oxidativo. En esta Tesis se ha abordado el estudio de péptidos que favorecen la absorción de minerales y péptidos que presentan actividades sobre la protección del epitelio gastrointestinal.

3.1. Péptidos que favorecen la absorción de minerales

Los minerales como calcio (Ca), zinc (Zn), hierro (Fe) y cobre (Cu) son elementos importantes para la salud humana ya que poseen una amplia variedad de funciones biológicas. Están estrechamente relacionados con la estructura tridimensional y funcional de las proteínas (Lyons y Eide, 2006). La absorción de minerales es un proceso complejo ya que la eficiencia de absorción no sólo depende de un número de factores como la condición fisiológica, bioquímica y hormonal, sino también en la ingesta dietética del mineral y su solubilidad. En diversos estudios se ha discutido la solubilidad de los minerales y la relación con su biodisponibilidad (Kim y col., 1995; Perales y col., 2006). La absorción de minerales se produce principalmente en la parte proximal del intestino delgado, donde el pH en estado de ayuno es de 7,0 y después de la ingestión de alimentos desciende hasta alrededor de 5,5. La condición ácida suave del contenido intestinal favorece la absorción de minerales en el duodeno proximal, mientras que el incremento

gradual del pH ($7,49 \pm 0,46$) en el íleon terminal disminuye la solubilidad de minerales y su absorción (Karava y Mahoney, 2011). La deficiencia de minerales es uno de los problemas nutricionales más importantes en todo el mundo, donde la deficiencia de hierro es la más común (OMS, 2001; FAO/OMS, 2002).

En los últimos años los péptidos bioactivos con capacidad de unir minerales han atraído un creciente interés en la industria alimentaria y farmacéutica. Los péptidos son capaces de unirse a otras sustancias y mejorar su estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad debido a su estructura con diversos residuos de cadenas laterales donantes de iones (Guo y col., 2014).

Los péptidos con capacidad de unir minerales son derivados de diversas fuentes de proteínas como los hidrolizados de leche y productos lácteos (Kim y col. 2007; Rui, 2009; O'Loughlin y col. 2014;), yema de huevo (Choi y col., 2005), cebada (Eckert y col., 2014), sésamo (Wang y col., 2012), garbanzo (Torres-Fuentes y col., 2012), girasol (Megías y col., 2008), ostras (Chen y col., 2013), anchoas (Wu y col., 2012), merluza (Jung y Kim, 2007), subproductos de camarón (Huang y col., 2011) y plasma sanguíneo porcino (Lee y Song, 2009). Sin embargo los péptidos con capacidad de unión de minerales más estudiados hasta ahora son los derivados de las proteínas lácteas.

3.1.1. Caseinofosfopeptidos

Como se ha comentado anteriormente, las caseínas son proteínas fosforiladas que representan alrededor del 80% del total de la proteína de la leche bovina y son una fuente importante de calcio y fósforo. La fosforilación se produce en los residuos de serina por esterificación con fosfato, y algunos residuos de fosfoserina se encuentran formando grupos de dos, tres o cuatro. El término caseinofosfopeptido (CPPs) se refiere a péptidos

fosforilados que se pueden liberar a partir de la caseína por digestión enzimática *in vivo* o *in vitro* (Bouhallab y Bouglé, 2004). Por la disposición de los residuos fosforilados, algunos CPPs se caracterizan por la presencia de tres grupos de fosfoserina seguidos por dos residuos de ácido glutámico (SpSpSpEE). Se localizan específicamente en las secuencias de α_{s1} -CN f(66-70), α_{s2} -CN f(8-12), α_{s2} -CN f(56-60) y β -CN f(17-21) y se unen fuertemente a cationes polivalentes, principalmente a calcio, aunque también lo hacen a otros cationes, como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , y Cu^{2+} . Su capacidad de unión es dependiente del pH, la fuerza iónica, la temperatura y la cantidad de fosfato presente en la solución (Philippe y col., 2005; Mittal y col., 2015). En la **Figura 2** se muestra la secuencia de las caseínas bovinas escritos en color verde los residuos de fosfoserina y en azul los residuos de ácido glutámico.



Figura 2. Secuencia de la α_{s1} -CN (variante B)8P, α_{s2} -CN (variante A)11P, β -CN (variante A₂)5P y κ -CN (variante A)1P bovinas.

Debido a la presencia de serinas fosforiladas, estas regiones son relativamente resistentes a la hidrólisis. Al estar cargados negativamente, pueden unir y solubilizar

elementos minerales como Ca (Phelan y col., 2009), Fe (Kibangou y col., 2005), y Zn (Miquel y Farré, 2007), así como manganesio, bario, cromo, níquel, cobalto, selenio y cobre actuando como agentes quelantes manteniéndolos en disolución al pH alcalino del intestino delgado distal y, de esta forma, aumentando su biodisponibilidad (FitzGerald, 1998; Zidane y col. 2012). En estudios *in vitro*, los CPPs han demostrado su capacidad para evitar la precipitación del calcio en presencia de fosfatos a pH básico (Berrocal y col., 1989). Aunque existe controversia acerca de la capacidad de los CPPs de potenciar la absorción de calcio *in vivo*, existe un considerable número de estudios en animales que demuestran el efecto positivo de los CPPs en la absorción de este mineral (Meisel y FitzGerald, 2003). Por ello, la elevada biodisponibilidad del calcio en la leche y productos lácteos se atribuye principalmente a la presencia de caseinofosfopéptidos que se forman durante la digestión de la caseína en el intestino delgado, donde tiene lugar la mayor absorción de este mineral (Boutrou y col., 2013).

Distintos estudios en modelos animales han demostrado la formación de CPPs tras la ingestión de leche, de productos lácteos fermentados, caseína o de sus fracciones y su acumulación en la porción distal del intestino delgado (Naito y Suzuki, 1974; Meisel y Frister, 1989; Kasai y col., 1992). Los CPPs más abundantes de la α_{S1} -caseína presente en el íleon de ratas tras ingerir CPPs fueron los péptidos α_{S1} -CN f(61-74) (Hirayama y col., 1992) y α_{S1} -CN f(59-79) (Brommage y col., 1991). En ratas alimentadas con CPPs se han identificado en el íleon secuencias de β -caseína como: β -CN f(1-25), β -CN f(1-28), β -CN f(33-48) (Brommage y col., 1991) y β -CN f(7-24) (Hirayama y col., 1992). En general, en estos estudios, los CPPs se determinaron de acuerdo a la fosforilación de aminoácidos en fracciones solubles preparadas a partir de los efluentes digestivos, identificados por MS.

En los CPPs, la secuencia característica SpSpSpEE se ha descrito como el principal factor que influye en su interacción con los minerales, aunque los residuos circundantes o

la longitud de la secuencia también pueden influir (Cross y col., 2007). Barbé y col., (2014) identificaron en los efluentes duodenales de mini-cerdos alimentados con una variedad de productos lácteos alrededor de 150 CPPs siendo la mayoría mono o difosforilados. Algunos de ellos podrían considerarse portadores de minerales sin embargo hasta ahora no se ha establecido su bioactividad (Boutrou y col., 2013). En digeridos humanos también se han identificado algunos CPPs después de la ingestión de leche, yogur y caseína (Chabance y col., 1998; Meisel y FitzGerald, 2003; Boutrou y col., 2013).

Los CPPs también pueden liberarse por hidrólisis *in vitro* por acción de diferentes enzimas, tales como tripsina, pancreatina, alcalasa, plasmina, o combinaciones de éstas, como la tripsina y la quimotripsina (Pinto y col., 2012). Las secuencias peptídicas que se formen dependerán de las diferentes condiciones de hidrólisis, incluyendo el pH, el tiempo de hidrolisis, la relación enzima: proteína y la temperatura. También se pueden formar durante la elaboración de productos lácteos bajo la acción de enzimas endógenas de la leche o de microorganismos (Bouhallab y Bouglé, 2004) por lo que algunos están presentes de forma natural en la leche (Baum y col., 2013), el yogur (Pinto y col., 2012) y en quesos (López-Expósito y col., 2012). Se ha visto que algunos CPPs que se han identificado *in vivo* en el tracto gastrointestinal son homólogos con los que se han formado tras la simulación de la digestión gástrica *in vitro* como es el caso de los obtenidos tras la digestión del queso Beaufort (Adt y col., 2011) empleando pepsina y pancreatina, y de β -CN digerida con pepsina (Schmelzer y col., 2007). La **Tabla 2** presenta algunos CPPs identificados tras la simulación de la digestión de distintos productos lácteos.

Tabla 2. Secuencias de caseinofosfopéptidos que resisten la simulación de la digestión gastrointestinal.

Proteína (fragmento)	Secuencia	Matriz	Enzimas	Referencia
s ₁ -CN f(33–52)2P	GKEKVNELSKDIGSESTEDQ	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α _{s1} -CN f(37–55)3P	VNELSKDIGSESTEDQAME	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(37–42)1P	VNELSK	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(40–70)7P	LSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESSISSEE	Caseína	1,4	Miquel y col., 2006b
α _{s1} -CN f(40–60)2P	LSKDIGSESTEDQAMEDIKQM	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α _{s1} -CN f(40–55)2P	LSKDIGSESTEDQAME	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α _{s1} -CN f(40–52)2P	LSKDIGSESTEDQ	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
		Caseína	1,4	Miquel y col., 2006b
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α _{s1} -CN f(41–52)2P	SKDIGSESTEDQ	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
		Caseína	1,4	Miquel y col., 2006b
		Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α _{s1} -CN f(41–50)2P	SKDIGSESTE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(42–55)2P	KDIGSESTEDQAME	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(42–51)2P	K DIGSESTED	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α _{s1} -CN f(42–50)2P	K DIGSESTE	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α _{s1} -CN f(43–56)2P	DIGSESTEDQAMED	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(43–55)2P	DIGSESTEDQAME	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
		Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(43–52)2P	DIGSESTEDQ	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
		Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α _{s1} -CN f(43–50)2P	DIGSESTE	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α _{s1} -CN f(44–56)2P	IGSESTEDQAMED	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(44–51)2P	IGSESTED	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α _{s1} -CN f(46–56)2P	SESTEDQAMED	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α _{s1} -CN f(55–76)5P	EDIKQMEAESSISSEEEIVPNSV	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α _{s1} -CN f(56–90)5P	DIKQMEAESSISSEEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSE	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α _{s1} -CN f(57–90)5P	IKQMEAESSISSEEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSE	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α _{s1} -CN f(62–85)5P	AESSISSEEEIVPNSVEQKHIQKED	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b

α_{s1} -CN f(64–74)4P	SISSSE EIVPN	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α_{s1} -CN f(73–79)1P	PNS VEQK	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α_{s1} -CN f(73–78)1P	PNS VEQ	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α_{s1} -CN f(73–90)1P	PNS VEQKH IQKEDVPSE	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α_{s1} -CN f(73–91)1P	PNS VEQKH IQKEDVPSEY	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α_{s1} -CN f(74–79)1P	NSVEQK	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(88–119)1P	SERYLGYLEQLRLKKYKVPQLEIVPN SAEER	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s1} -CN f(103–117)1P	KYKVPQLEIVPN SAE	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α_{s1} -CN f(104–119)1P	YKVPQLEIVPN SAEER	Caseína	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s1} -CN f(105–119)1P	KVPQLEIVPN SAEER	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α_{s1} -CN f(106–119)1P	VPQLEIVPN SAEER	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s1} -CN f(107–119)1P	PQLEIVPN SAEER	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s1} -CN f(108–118)1P	QLEIVPN SAEE	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s1} -CN f(109–125)1P	LEIVPN SAEER RLHSMKE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(109–119)1P	LEIVPN SAEER	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α_{s1} -CN f(109–118)1P	LEIVPN SAEE	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s1} -CN f(110–120)1P	EIVPN SAEER L	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(110–119)1P	EIVPN SAEER	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s1} -CN f(110–118)1P	EIVPN SAEE	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(111–118)1P	IVPN SAEE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(112–118)1P	VPN SAEE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(113–119)1P	PNS SAEER	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(113–116)1P	PNS SA	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s1} -CN f(114–119)1P	NSAEER	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s2} -CN f(1–19)4P	KNTMEHV SSSEESII SQET	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
α_{s2} -CN f(1–24)4P	KNTMEHV SSSEESII SQETYKQEK	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2005
α_{s2} -CN f(5–21)4P	EHV SSSEESII SQETYK	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
α_{s2} -CN f(6–13)3P	HV SSSEES	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α_{s2} -CN f(7–52)5P	V SSSEESII SQETYKQEKMAINPN SKEN LCSTFCKEVVRNANEEY	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
		Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
		Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b

α_{s2} -CN f(32–70)4P	KENLCSTFCKEVVRNANEEEEYSIGSSSEESA EVATEEVK	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(34–72)4P	NLCSTFCKEVVRNANEEEEYSIGSSSEESA EVATEEVKIT	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(53–63)4P	SIGSSSEESA E	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(53–65)4P	SIGSSSEESA	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
α_{s2} -CN f(99–132)2P	LYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSE	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(101–156)3P	QGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKKTCLTEE	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(108–153)3P	PWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKKTCL	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(111–147)3P	QVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKKTCL	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α_{s2} -CN f(124–150)3P	NREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKKTCL	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α_{s2} -CN f(124–146)3P	NREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKKTCL	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
α_{s2} -CN f(125–154)3P	REQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKKTCL	Caseínas	1,4	Miquel y col., 2006b
α_{s2} -CN f(138–150)1P	TVDMESTE VFTKKTCL	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α_{s2} -CN f(138–148)1P	TVDMESTE VFTKKTCL	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
α_{s2} -CN f(138–146)1P	TVDMESTE VFTKKTCL	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García -Nebot y col., 2010
β -CN f(1–25)3P	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β -CN f(1–25)4P	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
		Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β -CN f(1–24)4P	RELEELNVPGEIVESLSSSEESIT	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García-Nebot y col., 2010
β -CN f(1–28)4P	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINK	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β -CN f(1–32)4P	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIEK	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
β -CN f(1–52)5P	RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIEKFQSEEQQTEDELQD KIHPF	Formulas infantiles	1,4	Miquel y col., 2005
β -CN f(2–25)4P	ELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β -CN f(6–25)4P	LNVPGEIVESLSSSEESITR	Leche en polvo	1,4	Sánchez-Rivera y col., 2014
β -CN f(7–25)3P	NVPGEIVESLSSSEESITR	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez -Rivera y col., 2014
β -CN f(8–19)1P	ELEELNVPGEIVESLSSS	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β -CN f(11–16)1P	EIVESL	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García-Nebot y col., 2010
β -CN f(12–25)4P	IVESLSSSEESITR	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β -CN f(12–24)4P	IVESLSSSEESIT	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García-Nebot y col., 2010
β -CN f(14–19)4P	ESLSSS	Leche en polvo	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β -CN f(15–24)4P	SLSSSEESIT	Bebida de frutas + CPPs	1,4	García-Nebot y col., 2010

β-CN f(16–27)3P	LSSSEESITRIN	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(29–56)1P	KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHFAQTQ	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(29–54)1P	KIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHFAQ	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(29–46)1P	KIEKFQSEEQQQTEDELQ	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(29–45)1P	KIEKFQSEEQQQTEDEL	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(30–52)1P	IEKFQSEEQQQTEDELQDKIHFP	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(30–51)1P	IEKFQSEEQQQTEDELQDKIHP	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(30–45)1P	IEKFQSEEQQQTEDEL	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(30–42)1P	IEKFQSEEQQQTE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(30–40)1P	IEKFQSEEQQQ	Caseína	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(30–37)1P	IEKFQSEE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(32–45)1P	KFQSEEQQQTEDEL	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(32–43)1P	KFQSEEQQQTED	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(32–42)1P	KFQSEEQQQTE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(33–55)1P	FQSEEQQQTEDELQDKIHFAQT	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(33–52)1P	FQSEEQQQTEDELQDKIHFP	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(33–51)1P	FQSEEQQQTEDELQDKIHP	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(33–43)1P	FQSEEQQQTED	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
		Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
		Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
		Leche en polvo	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(33–42)1P	FQSEEQQQTE	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
		Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(33–40)1P	FQSEEQQQ	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(33–37)1P	FQSEE	Queso Valdeón	1,2,3	Sánchez-Rivera y col., 2014
β-CN f(33–48)1P	FQSEEQQQTEDELQDK	Queso Beaufort	1,4	Adt y col., 2011
β-CN f(35–53)1P	SEEQQQTEDELQDKIHFA	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010
β-CN f(35–52)1P	SEEQQQTEDELQDKIHFP	Caseínas	1,4	Picariello y col., 2010

1 Pepsina

2 Tripsina

3 Quimotripsina

4 Pancreatina

El efecto de los CPPs sobre la biodisponibilidad de minerales se ha evaluado mediante estudios *in vitro* e *in vivo* (Guo y col., 2014). En el caso del hierro, los CPPs mostraron un efecto positivo sobre este parámetro con un aumento de los niveles de hemoglobina y hematocrito, así como en el almacenamiento de hierro en hígado de ratas deficientes de hierro que fueron alimentadas con β -CN hidrolizada con hierro o con β -CN f(1-25)4P (Aït-Oukhatar y col., 1999). Del mismo modo, los niveles de hierro en sangre se incrementaron en ratas después de la ingestión de hierro unido a caseína hidrolizada (Chaud y col., 2002). Estos resultados fueron confirmados mediante un sistema de bucle intestinal perfundido en ratas, donde el hierro unido a β -CN f(1-25)4P aumentó la absorción de este mineral en ratas deficientes de hierro (Pérès y col., 1999a; Aït-Oukhatar y col., 2002; Bouhallab y col., 2002; Ani-Kibangou y col., 2005). Además, algunas fracciones de CPPs ejercen diferentes efectos sobre la absorción de hierro, siendo este efecto mayor cuando el hierro estaba unido a fracciones de β -CN que a fracciones de α -CN (Bouhallab y col., 2002; Kibangou y col., 2005), lo que sugiere la influencia de las características estructurales y conformaciones de CPPs en su capacidad para mejorar la biodisponibilidad de hierro.

En los seres humanos, el efecto de los CPPs sobre la biodisponibilidad de hierro es controvertido. Mientras Hurrell, y col. (1989) observaron que la absorción de hierro mejoraba después de la ingesta de hidrolizados de caseína, Aït-Oukhatar y col., (2002) no observaron ningún efecto en la absorción del hierro tras la ingesta de hierro unido a β -CN f(1-25). En estudios *in vivo* con otros minerales, como el zinc, también se han encontrado resultados variables. Así, Hansen y col., (1996) detectaron un aumento de la absorción de zinc en crías de rata tras la ingesta de un alimento infantil adicionado con CPPs. Sin embargo, Matsui y col., (2002), no encontraron un aumento significativo en la biodisponibilidad de zinc en ratas que consumieron una dieta a base de proteínas de soja

enriquecida con CPPs. Estos resultados indican que el efecto de los CPPs sobre la biodisponibilidad de minerales puede estar relacionado con las características del diseño experimental, las propiedades fisicoquímicas del mineral, la matriz del alimento y posibles interacciones con los constituyentes de la dieta, por lo que habría que tener en cuenta todas estas variables en el diseño experimental de ensayos clínicos con estos ingredientes.

La producción de CPPs con fines comerciales generalmente se realiza a partir de la hidrólisis de caseína o caseinato de sodio, con procesos similares al que se muestra en la **Figura 3**.

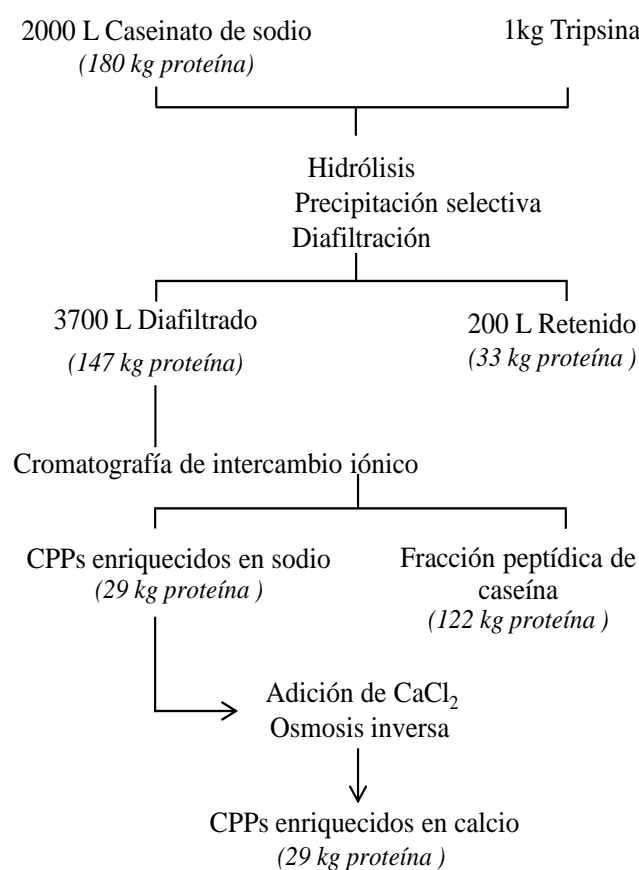


Figura 3. Representación esquemática del proceso a nivel industrial de la obtención de caseinofosfopéptidos a partir de caseinato de sodio. Adaptada de Ellegard y col., (1999).

Para aislar o enriquecer los CPPs a partir de un hidrolizado de caseína, se han empleado distintas técnicas. Una de las más empleadas por su sencillez, es la precipitación selectiva con CaCl_2 y etanol utilizando un intervalo de pH entre 3,5 a 8,5 (Reynolds y col., 1994; Aoki y col., 1998; Zhao y col., 2007). Además, se han utilizado otros métodos como la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) con dióxido de titanio (Picariello y col, 2010), así como la combinación de precipitación selectiva a pH 7,0 con galio (Zhu y FitzGerald, 2010), la cromatografía de afinidad con óxidos metálicos (OMAC-TiO₂) en donde el grupo fosfato puede unirse a la superficie de estos en forma más específica que el IMAC (Wang y col., 2012). Otra alternativa es la cromatografía basada en microgránulos de hidroxiapatita donde la caseína se une a los microgranulos de hidroxiapatita a través de los grupos fosfatos (Mazanek y col., 2010).

Adicionalmente, a los CPPs también se les atribuye actividad anticariogénica por su capacidad para aumentar el nivel de fosfato cálcico del esmalte dental y así influir en los procesos de desmineralización/remineralización. Esta actividad se ha confirmado en modelos animales y en humanos (Aimutis, 2004). Así, la adición de leche en polvo o caseína a la dieta de animales reduce la aparición de caries. También se ha podido demostrar esta actividad anticariogénica en el queso, que se ha correlacionado con los niveles de caseína y fosfato cálcico (Reynolds, 2003). Siete ensayos clínicos en humanos enfocados a la prevención de la caries dental han demostrado la capacidad de los preparados de CPPs con fosfato cálcico amorfo para remineralizar las lesiones del esmalte dental de forma dosis-dependiente (Azarpazhooh y Limeback, 2008).

Tabla 3. Técnicas de aislamiento e identificación de caseinofosfopéptidos

Matriz (Digerido)	Enzimas	Concentración	Análisis	Referencia
Caseína	Tripsina	Etanol y CaCl ₂ pH 3,5; 4,6 y 8,0	RP-HPLC	Reynols y col., 1994
	Tripsina Pancreatina Alcalasa Proteasas comerciales Proteasas <i>L. helveticus</i> Pepsina y pancreatina	Etanol y CaCl ₂ pH4,6; 7,0 y 8,0	RP-HPLC-MS/MS	Adamson y Reynolds 1995a Adamson y Reynolds 1995b, 1997 Adamson y Reynolds 1996 McDonagh y FitzGerald 1998 Corsetti y col., 2003 Miquel y col., 2006bc
	Tripsina	ZrO ₂	RP-HPLC-MS/MS SELDI-MS/MS	Cuccurullo y col., 2007
	Mezcla de enzimas	TiO ₂	MALDI-TOF-MS	Picariello y col., 2010
α_{s2} -CN y β -CN	Pepsina y pancreatina	Etanol y CaCl ₂ pH 4,7 y 8,0	RP-HPLC-MS/MS	Miquel y col., 2006bb
Fórmulas infantiles				Miquel y col., 2006ba
Yogur, leche y queso Camembert	Tripsina			Kawahara y col., 2005
Queso Beaufort	Pepsina y pancreatina			Adt y col., 2011
Queso Reggiano (sin hidrólisis)		IMAC-Fe ⁺³	CE-HPLC	Lund y Ärdo 2004

Por tanto, los CPPs tendrían diferentes e importantes aplicaciones en el campo nutricional y en el farmacológico. Estos péptidos permitirían la prevención de osteoporosis, recalcificación de los huesos por presentar actividad estimuladora del crecimiento y diferenciación de osteoblastos (Tulipano y col., 2010), y la prevención de la caries dental, siendo esta aplicación terapéutica la más utilizada actualmente (Cross y col., 2007; Nongonierma y FitzGerald, 2012). Además, se han propuesto otros efectos como cierta actividad antihipertensiva, actividad antioxidante (Diaz y col., 2003; Kitts, 2005), inmunomoduladora (Phelan y col., 2009), efectos citomoduladores (Meisel y FitzGerald, 2003), efectos sobre la secreción gástrica (Guilloteau y col., 2009), y efectos antimicrobianos (Arunachalam y Raja, 2010). Los CPPs podrían utilizarse como suplementos para fortificar alimentos, con el fin de mejorar la biodisponibilidad mineral y por su efecto anticariogénico, además de merecer futuros estudios por las actividades previamente mencionadas. En la **Tabla 4** se muestran algunas preparaciones comerciales enriquecidas con CPPs.

Tabla 4. Ejemplos de productos comerciales que contienen caseinofosfopéptidos. Adaptada de Phelan y col. (2009) y Pinto y col., (2012).

Nombre del producto	Fabricante	Tipo de alimento	Beneficios a la salud
Capolac	Arla foods, Dinamarca	Ingrediente	Favorece la absorción de minerales
CE90CPP	DMV, Holanda	Ingrediente	Favorece la absorción de minerales
HCP 102/HCP 105	Tatua, Nueva Zelanda	Ingrediente	Favorece la absorción de minerales
Kotsu Kotsu	Asahi, Japón	Bebida suave	Favorece la absorción de minerales
Recaldent	Cadbury Adams, EE.UU.	Chicle	Anticariogénico
Recaldent	GC Tooth Mousse, EE.UU.	Pasta para dientes	Anticariogénico
Tekkotsu Inryou	Suntory, Japón	Bebida suave	Favorece la absorción de minerales

3.1.2. Péptidos de suero lácteo capaces de tener afinidad al hierro

Las proteínas de suero también pueden servir como fuente para obtener péptidos capaces de unirse a minerales. La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con hierro por constituir uno de los microelementos más importantes en nutrición humana. Según la FAO, la deficiencia de hierro representa uno de los trastornos nutricionales más importantes en todo el mundo (FAO/OMS, 2003), y es especialmente común que todos los países necesiten un mayor requerimiento de hierro, bien por una ingesta insuficiente o una baja biodisponibilidad del mismo. En este contexto, la suplementación de hierro en la dieta y el enriquecimiento de este en ciertos alimentos se han presentado como soluciones a esta situación clínica (Gaucheron, 2001). Sin embargo, el uso de diferentes sales de hierro ha mostrado un mal sabor, baja biodisponibilidad y varios efectos secundarios como náuseas, diarrea y otras alteraciones gastrointestinales (Schumann y col., 2007). En este sentido, la administración de hierro en forma de complejos de hierro ha mostrado características positivas, como una mejor biodisponibilidad y baja incidencia de efectos secundarios (Lynch, 2005; Eisenstadt y col., 2013).

Aunque las caseínas contienen más sitios y mayor afinidad que las proteínas del suero para unirse al hierro debido a la presencia de residuos de fosfoserina como ya se ha comentado, la unión de hierro a las proteínas de suero también se ha descrito (Sugiarto y col., 2009). Los péptidos derivados de las principales proteínas de suero, β -Lg y α -La, han demostrado una importante afinidad por el hierro, superior que las proteínas nativas (Svenning y Vegarud, 1998). En un estudio para optimizar la capacidad de fijación del hierro en hidrolizados enzimáticos de β -Lg, Zhou y col., (2012) comprobaron que la β -Lg tenía menor capacidad de fijación de hierro que sus hidrolizados. Por ello, existe un creciente interés en el estudio de los hidrolizados y las fracciones derivadas de proteínas de suero de leche debido a su evidente capacidad de fijación de hierro y consiguiente aumento

de su biodisponibilidad (Wang y col., 2014). Se sabe que la hidrólisis de las proteínas de suero de leche con diferentes enzimas forma péptidos con capacidad quelante de hierro, como por ejemplo los hidrolizados con Alcalasa[®] (Kim y col., 2007), papaína y Neutrasa[®] (Ou y col., 2010). Sin embargo, no se conoce la secuencia de los péptidos responsables de la afinidad por el hierro. Algunos ejemplos de secuencias, que sí se han descrito, son DLGEQYFKG obtenido a partir de plasma sanguíneo porcino (Lee y Song, 2009), PGPIP_N procedente de la β -CN (Argyri y col., 2007), LPTGPKS derivado de proteínas de camarones y subproductos de ellos (Huang y col., 2012), SCH procedente de piel de abadejo de Alaska (Guo y col., 2013) y TDPI(L)AACI(L) derivado de proteína de espirulina (Kim y col., 2014).

El escaso conocimiento que existe sobre la relación entre la estructura de los péptidos y su capacidad de unir hierro no permite anticipar la actividad empírica de dichos péptidos ante el hierro. Sin embargo, se conoce la notable actividad proteolítica que ejercen las enzimas Alcalasa[®], pancreatina, y Flavourzyme[®] sobre las proteínas de suero de leche al compararse con otras enzimas (Kim y col., 2007). Recientemente, se ha descrito que la fracción menor de 5 kDa de hidrolizados de proteína de suero obtenidos de forma individual con estas tres enzimas mostró una notable capacidad de unir hierro detectada por una mejora en la dializabilidad de dicho mineral (De la Hoz y col., 2014a).

3.2. Péptidos con actividad estimulante de la producción de mucinas

Una función clave del epitelio intestinal es actuar como barrera física entre el medio externo y el interno. La superficie intestinal está cubierta por una capa mucosa que juega un importante papel fisiológico que incluye la lubricación de la superficie celular, la defensa frente a la colonización por bacterias patógenas y protección frente a las proteasas intestinales. Los principales componentes estructurales del mucus son las mucinas, que son

glicoproteínas de alto peso molecular capaces de formar geles viscoelásticos y responsables de las propiedades reológicas del mucus (Roussel y col., 1988, Jonckheere y col., 2014).

Las mucinas son producidas por las células caliciformes de la superficie epitelial. El epitelio del intestino tanto delgado como grueso, contiene células caliciformes productoras de mucinas (**Figura 4**). Mediante la clonación de ADNc, se conocen al menos 19 genes humanos responsables de la codificación de mucinas. La mucina 2 codificada por el gen MUC2 es la mucina formadora de gel predominante en el intestino sano del humano, rata y ratón (Pérez-Vilar y Hill, 2004; Liévin-Le y Servin, 2006). Cualquier situación experimental o patológica que cambie directa o indirectamente la cantidad de mucina, su estructura o el contenido acuoso o iónico va a provocar una alteración en la barrera mucosa (Moughan y col., 2013).

La úlcera gástrica (Slomiany y Slomiany, 2002), la colitis ulcerosa (van der Sluis y col., 2006) y el cáncer de colon (Velchich y col., 2002) son ejemplo de las consecuencias de un fallo en la expresión y/o composición del mucus intestinal (Corfield y col., 2000; Babu y col., 2006).

Estudios recientes han demostrado que algunos componentes de la dieta pueden influir positivamente sobre las características del mucus intestinal, aunque el modo de acción de cada compuesto puede diferir. Algunos ácidos grasos de cadena corta y fibras dietéticas parecen favorecer la capacidad total de secreción de mucinas en el lumen del intestino delgado, aunque en el caso de las fibras el efecto estimulador de la secreción es dependiente de la cantidad, así como de la calidad de la fibra dietética ingerida (Tanabe y col., 2005) y puede deberse a un incremento en la síntesis de mucina o en el número de células caliciformes (Barcelo y col., 2000; Gaudier y col., 2004; Ito y col., 2009). Se ha

demostrado que concentraciones bajas de butirato estimulan la expresión de MUC2 mientras que elevadas concentraciones de este ácido graso de cadena corta reprimen la expresión, lo que puede hacer disminuir la función intestinal de barrera (Burger van Paassen y col., 2009).

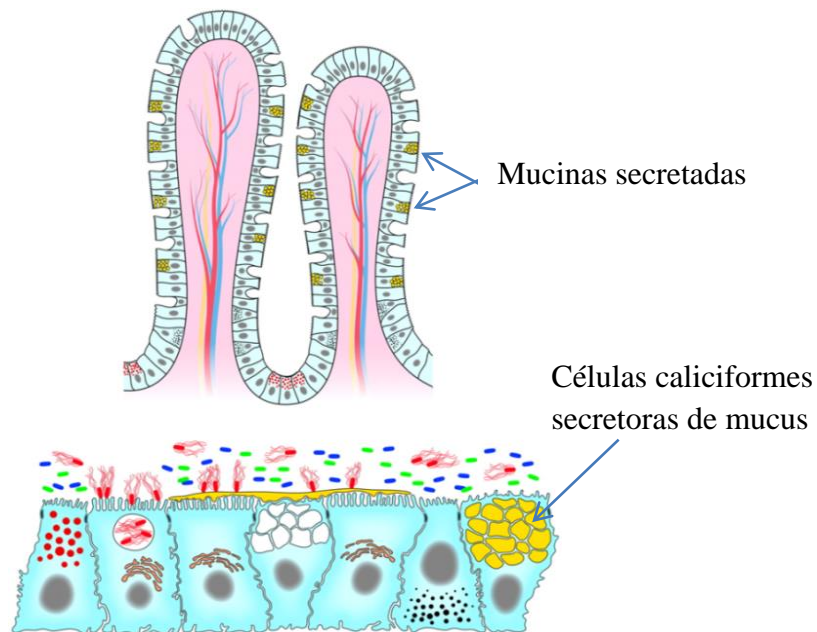


Figura 4. Epitelio intestinal que recubren el tracto intestinal. Adaptada de Liévin-Leu y Servin, (2006).

Algunos péptidos lácteos con actividad opioide como las β -casomorfina derivadas de la β -CN concretamente la β -casomorfina 7, inducen la producción de mucina en yeyuno de rata mediante la activación del sistema nervioso entérico y de los receptores opioides (Claustre y col., 2002; Trompette y col., 2003; Plaisancié y col., 2013). La presencia de estos receptores en células intestinales sugiere la posibilidad de que las β -casomorfina, que se producen en el lumen intestinal durante la digestión, pueden controlar la producción de mucinas mediante la acción directa sobre las células caliciformes intestinales. Además, Zoghbi y col., (2006) demostraron la estimulación en la secreción de mucinas y el

incremento en la expresión de los genes Muc2 y Muc3 en células intestinales DHE de rata, y del gen MUC5AC en células HT29-MTX intestinales humanas, inducidos por β -casomorfina 7 . Recientemente, se ha encontrado que un hidrolizado de proteínas de suero de leche rico en péptidos derivados de β -Lg induce la secreción de mucina y la expresión del gen de MUC5AC en células HT29-MTX (Martínez-Maqueda y col., 2013). En concreto, se ha encontrado que el tetrapéptido YGLF, α -lactorfina, aumenta la expresión del gen 5AC de la mucina MUC5AC en células intestinales (Martínez-Maqueda y col., 2012). Además, se ha encontrado que el péptido GVSKVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQ correspondiente al fragmento de β -CN (94-123) presente en yogures, aumenta el número de células caliciformes y la expresión de las mucinas intestinales MUC2 y MUC4 en ratas (Plaisancié y col., 2013).

Los péptidos opioides de la leche son generados por hidrólisis de las caseínas y proteínas del suero (Teschemacher y col., 1997), tanto en hidrolizados enzimáticos como *in vivo* durante la digestión gastrointestinal (Svedberg y col., 1985). Además, el procesado de productos comerciales puede favorecer la liberación de los péptidos opioides, por ejemplo, en quesos (Sienkiewicz-Szłapka y col., 2009; de Noni y Cattaneo, 2010) y en fórmulas infantiles (Jarmolowska y col., 2007). La β -casomorfina 7 también se ha identificado en la digestión gastrointestinal simulada de una fórmula infantil (Hernández-Ledesma y col., 2004). Los estudios publicados que muestran evidencias de la actividad estimulante de la producción de mucinas en ensayos *ex-vivo*, *in vitro* y/o *in vivo* se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Proteínas lácteas y péptidos con actividad estimulante sobre la producción de mucinas intestinales.

Proteína (fragmento) ^a	Secuencia	Modelo ^b	Estimulación secreción	Sobreexpresión génica (genes) ^c	Referencia
Caseína hidrolizada	-	Yeyuno de rata (<i>ex vivo</i>)	Sí		Claustre y col., 2002
	-	Ratas (<i>in vivo</i>)	Sí	Muc3 y Muc4	Han y col., 2008
α_{S1} -CN f(90-94)	RYLGY	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2013
α_{S1} -CN f(143-149)	AYFYPEL	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2012; 2013
α_{S1} -CN f(144-149)	YFYPEL	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2013
β_H -CN f(51-55)	YPFVE	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2012
β_B -CN f(60-63)	YFPF-NH ₂	Yeyuno de rata (<i>ex vivo</i>)	Sí		Trompette y col., 2003
β_B -CN f(60-66)	YFPFGPI	Yeyuno de rata (<i>ex vivo</i>)	Sí		Claustre y col., 2002, Trompette y col., 2003
		Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Zoghbi y col., 2006
		Células DHE	Sí	Muc2 y Muc3	Zoghbi y col., 2006
β_B -CN f(94-123)	GVSKVKEAMAPKHKEM	Células HT29-MTX	Sí	MUC2 y MUC4	Plaisancié y col., 2013
	PFPKYPVEPFTESQ	Ratas (<i>in vivo</i>)	Sí (Muc4)	Muc2 y Muc4	
Aislado de proteína de suero	-	Ratas (<i>in vivo</i>)	Sí		Castro y col., 2010
Concentrado de proteína de suero hidrolizado	-	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2012; 2013
Proteína de suero de quesería	-	Ratas (<i>in vivo</i>)	Sí		Sprong y col., 2010
α -La	-	Células RGM1	Sí		
	-	Ratas (<i>in vivo</i>)	Sí		Ushida y col., 2007
α -La hidrolizada	-	Yeyuno de rata (<i>ex vivo</i>)	Sí		Claustre y col., 2002
	-	Ratas (<i>in vivo</i>)	Sí		Mezzaroba y col., 2006
$\alpha_{B,H}$ -La f(50-53)	YGLF-NH ₂	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2012
β_β f(102-105)	YLLF-NH ₂	Células HT29-MTX	Sí	MUC5AC	Martínez-Maqueda y col., 2012

a: Fuente proteica (subíndices). B: Bovina; H: Humana. Abreviaturas proteínas. CN: Caseína; La: Lactoalbúmina; Lg: Lactoglobulina

b: Procedencia de líneas celulares. HT29-MTX: Humana; DHE: Rata; RGM1:Rata.

3.3. Péptidos con actividad antiulcerogénica

Las úlceras pépticas son un trastorno común que se produce principalmente en el estómago y el duodeno proximal. Las úlceras pépticas son el resultado de un desequilibrio entre los factores agresivos, por ejemplo, la exposición de etanol, la ingestión frecuente de medicamentos antiinflamatorios no esteroides o la acción de la bacteria *Helicobacter pylori*, y los factores citoprotectores, que incluyen la función de la barrera mucobicarbonato, fosfolípidos activos de superficie, prostaglandinas (PGs), el óxido nítrico (NO), el flujo sanguíneo de la mucosa, la renovación celular y la migración, antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos y algunos factores de crecimiento (Wallace y Granger, 1996; Tarnawski y col., 2012).

Sustancias con grupos sulfhidrilo como la cisteína, glutatión (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH) y otros compuestos, pueden proteger la mucosa gástrica actuando como antioxidantes capturando los radicales libres y regulando la funcionalidad e integridad de las membranas celulares (Szabo y col., 1992). Se ha observado que GSH en conjunción con las prostaglandinas, PGE₂ y PGI₂, protegen a la mucosa gástrica frente a los radicales libres y otros agentes agresivos. El bloqueo de estas sustancias protectoras agrava la erosión gástrica y las lesiones ulcerativas producidas por agentes químicos y estrés.

Dentro de los modelos animales para evaluar las úlceras gástricas se encuentra el modelo de lesiones ulcerativas producidas por etanol. El etanol absoluto actúa destruyendo las células de la mucosa por contacto directo independiente de la acidez gástrica. Destruyen inicialmente las capas protectoras del estómago y finalmente alcanza la mucosa superficial, causando necrosis celular y liberación de mediadores vasoactivos responsables de la vasoconstricción, edema y hemorragia. Existen básicamente dos conjuntos de mecanismos de acción para las drogas antiulcerosas. El primero controla los procesos de

secreción gástrica. El segundo, se refiere a los mecanismos que aumentan la resistencia de las células de la mucosa gástrica contra factores agresivos, como el HCl, la pepsina, la ingesta de etanol y fármacos antiinflamatorios no esteroideos. La carbenoxolona sódica es un fármaco con actividad antiulcerogénica comprobada, ampliamente utilizada para tratamientos de úlceras. Su mecanismo de acción consiste en aumentar la síntesis de prostaglandinas en la mucosa gástrica, inhibiendo la síntesis de enzimas que promueven el catabolismo de las prostaglandinas.

Entre las actividades biológicas descritas para las proteínas de suero, también se incluye su capacidad antiulcerogénica. Esta función protectora de la mucosa gástrica de las proteínas de suero se atribuye al aumento de la síntesis de GSH celular. Varios trabajos proponen que la liberación de péptidos durante la digestión de las proteínas de suero de leche bovina estimula la síntesis de glutatión, ejerciendo una acción protectora (Matsumoto y col., 2001; Mezzaroba y col., 2006). Asimismo, se ha encontrado que la administración oral de α -La aumenta el nivel de PGE₂ y el contenido de mucina tanto del fluido gástrico como de la capa de gel de moco adherente (Ushida y col., 2003; Mezzaroba y col., 2006). Esta proteína también causó respuestas de PG-independientes, tales como aumento del pH gástrico luminal y el volumen de líquido, y el retraso en el vaciado gástrico (Ushida y col., 2003). También, se ha comprobado que la α -La ejerce una actividad gastroprotectora cuando se induce la ulceración gástrica a ratas actuando esta proteína sobre los principales componentes macromoleculares del moco, y en el espesor de la capa del gel de moco, siendo este efecto potenciador independiente del nivel de PGE₂ endógeno (Ushida y col., 2007). No sólo α -La, también los concentrados de proteína de suero de leche (WPC) o aislados de proteína de suero (WPI) que contienen esta proteína han demostrado este efecto protector contra las lesiones ulcerosas, y estos efectos fueron atribuidos a la gastrina, los grupos sulfhidrilo y a algunos mecanismos relacionados con la producción de moco

(Rosaneli y col., 2004; Castro y col., 2010). La actividad antiulcerogénica de estos WPC se atribuyó a su contenido de α -La. Sin embargo, hasta el momento, no se ha descrito ningún efecto antiulcerogénico para β -Lg (Matsumoto y col., 2001). Recientemente, se encontró que un queso elaborado con WPC presentó cierta protección contra la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico y el efecto se atribuyó a su contenido de treonina y cisteína en la síntesis de mucinas, dado que estos aminoácidos están limitados a causa de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Sprong y col., 2010). Un WPC hidrolizado con extractos de *Cynara cardunculus* ha demostrado un efecto protector contra las lesiones ulcerosas inducidas por etanol. La actividad protectora del hidrolizado se atribuyó a la estimulación de PGs y NO, mientras que el efecto de la fracción menor de 3 kDa, se explicó por los compuestos sulfhidrilo (Tavares y col., 2011).

En relación con el fortalecimiento del moco, ciertos péptidos alimentarios han demostrado una actividad estimulante sobre la secreción de mucina intestinal que también podría contribuir a su efecto antiulceroso. En este sentido, faltaría por verificar mediante estudios *in vivo*, si los péptidos que inducen la secreción de mucinas intestinales, podrían ejercer una actividad protectora de la mucosa intestinal por ejemplo, previniendo la formación de úlceras gástricas.

3.4. Péptidos que modulan la proliferación celular. Lunasina de soja

En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en todo el mundo. Estudios epidemiológicos indican que el 90-95% de los casos de cáncer se atribuyen a factores ambientales y al estilo de vida (Anand y col., 2008). La modificación de algunos factores como los hábitos nutricionales y el consumo de alimentos que contengan componentes bioactivos podrían ofrecer una protección significativa contra el cáncer (Kelloff y col., 2000; Guijarro-Diez y col., 2014). Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han

demostrado que un gran número de compuestos naturales presentes en los alimentos pueden reducir el riesgo de padecer cáncer (De Kok y col., 2008). Los alimentos de origen vegetal, que contienen cantidades significativas de fitoquímicos bioactivos, más allá de contribuir a la nutrición básica también pueden proporcionar beneficios para la salud al reducir el proceso cancerígeno. La soja contiene una variedad de fitoquímicos anticancerígenos. En los últimos años, las proteínas y péptidos derivados de la soja se han convertido en un grupo de nutraceuticos que han focalizado mucho interés, dado sus resultados en la prevención de las diferentes etapas de cáncer (De Mejia y Dia, 2010). Estos compuestos de naturaleza proteica de origen natural tienen ciertas ventajas con respecto a otros tipos de moléculas quimioterapéuticas, ya que poseen gran afinidad por ciertos tipos celulares, tienen facilidad de penetración en los tejidos, cuentan con una fuerte especificidad por dianas celulares y muestran baja toxicidad (Bhutia y Maiti, 2008).

Diversos estudios han puesto de manifiesto el potencial de la lunasina como quimiopreventivo y/o agente quimioterapéutico. Inicialmente se demostró que la lunasina no tenía ningún efecto en la morfología ni en la proliferación de células en ausencia de carcinogénesis (Lam y col, 2003). Sin embargo, la lunasina era capaz de suprimir tanto la transformación química y viral, como aquella inducida por la oncogénesis en células mamarias (Hernández-Ledesma y col., 2010; Dia y de Mejia 2011a y b; Pabona y col., 2013).

En los modelos celulares de cáncer de mama y colon, la lunasina ejerce efectos bloqueantes del ciclo celular, inductores de apoptosis y moduladores de biomarcadores asociados al proceso de carcinogénesis. Se ha propuesto un modelo epigenético de actuación de la lunasina por su capacidad de localizarse en el núcleo celular inhibiendo la acetilación de las histonas H3 y H4, lo que es percibido por la célula como un proceso anormal provocando el bloqueo del ciclo celular y la inducción de apoptosis (De Lumen,

2005; Hernández-Ledesma y col., 2010). En modelos animales se han confirmado estos efectos de la lunasina frente al cáncer de piel (Gálvez y col., 2001), mama (Hsieh y col., 2010a y b), colon (Díaz y de Mejía, 2011a y b y 2013), y linfoma (Chang y col., 2014).

Adicionalmente, se ha demostrado, tanto por métodos químicos como en modelos celulares, que la lunasina tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que podrían contribuir a su actividad quimiopreventiva. Recientemente, se ha observado que la lunasina reduce los efectos negativos de agentes químicos oxidantes sobre la viabilidad de células intestinales Caco-2 diferenciadas (García-Nebot y col., 2014) y en células hepáticas HepG2, inhibiendo también la generación de especies reactivas de oxígeno (Fernández-Tomé y col., 2014).

Estudios *in vivo* de biodisponibilidad de la lunasina simulando la acción de las enzimas digestivas sobre ella, tanto sintética como purificada de fuentes naturales, han demostrado que se hidroliza por la acción de la pepsina y pancreatina (Park y col., 2007). Sin embargo, la lunasina es capaz de sobrevivir, al menos parcialmente, tras el ataque de estas enzimas, cuando la digestión se llevó a cabo sobre un extracto de soja u otras plantas, conteniendo diferentes proteínas y péptidos. Se ha demostrado que, en el caso de un extracto de soja, entre un 60-80% de la lunasina inicial sobrevive a la hidrólisis por pepsina y pancreatina durante 2 horas (Park y col., 2007). Jeong y col., (2007a, b, c), observaron que aproximadamente un 85% de la lunasina inicial contenida en el extracto crudo de proteínas de *Solanum nigrum* L. permanecía intacta después de una digestión simulada durante 2 horas. Ambos resultados sugieren que existe alguna molécula que está protegiendo a la lunasina de la digestión. Alguno de estos compuestos protectores podrían ser el BB1 y el KTI (Jeong y col., (2007a, b, c; Hsieh y col, 2010c; Park y col., 2007) (**Figura 5**). Además, se ha sugerido la importancia de la proporción de lunasina:BB1 en la

protección de la digestión de lunasina frente a las enzimas gástricas (Hernández-Ledesma y col., 2009). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

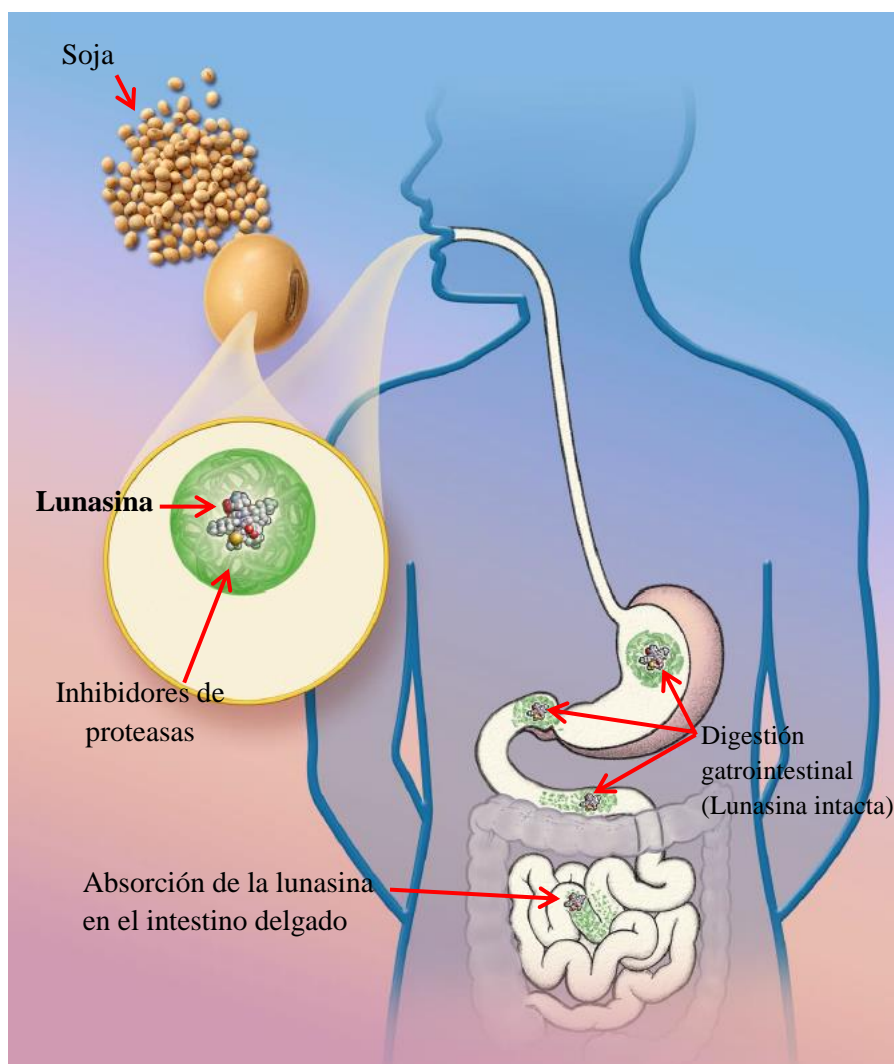


Figura 5. Protección de la lunasina por los inhibidores de proteasas frente a la acción de las enzimas digestivas (SoyLabs, 2012).

La biodisponibilidad de la lunasina se ha estudiado también *in vivo*, tanto en modelos animales como en humanos, confirmando los resultados que se obtuvieron *in vitro*. Hsieh y col., (2010c) demostraron la biodisponibilidad de la lunasina cuando se administra oralmente a ratas y ratones. Se ha descrito la absorción de lunasina (sintetizada químicamente) en ratón, observándose su distribución en diferentes tejidos, incluyendo pulmón, glándulas mamarias, próstata, cerebro, riñones e hígado. Además, la lunasina

extraída del hígado y de la sangre mantenía su actividad. Estudios similares extrayendo lunasina intacta y activa de plasma e hígado de ratones a los que se les administró lunasina procedente de soja (Jeong y col., 2007a), trigo (Jeong y col., 2007b), centeno (Jeong y col., 2009) y cebada (Jeong y col., 2010) han confirmado los mismos resultados. Además, se ha detectado lunasina en el plasma de voluntarios sanos que consumieron 50 g de proteína de soja durante 5 días. En las muestras de sangre a los 30 y 60 minutos después de la ingesta se encontraba en el plasma un 4,5% de la lunasina ingerida (Dia y col., (2009).

4. Aplicación de la peptidómica en el estudio de proteínas y péptidos lácteos bioactivos

La aplicación de la espectrometría de masas (MS) normalmente precedida de distintas técnicas de separación de alta resolución, se está convirtiendo en una herramienta muy útil para el análisis cualitativo y/o cuantitativo de las mezclas de proteínas y péptidos presentes en los alimentos o tras la digestión de los mismos.

4.1. Identificación de péptidos presentes en productos lácteos

Muchos de los productos lácteos comerciales contienen péptidos bioactivos, los cuales se pueden formar durante los procesos de fabricación, por ejemplo, tratamiento térmico o durante el proceso de almacenamiento, pero principalmente se producen durante la fermentación y/o la maduración de dichos productos (Hernández-Ledesma y col., 2011). Además, los péptidos se pueden encontrar en la leche como resultado de la proteólisis natural de las proteínas lácteas. Mientras que algunos estudios de investigación están orientados a determinar péptidos específicos con cierta actividad interesante conocida, otras investigaciones están encaminadas a proporcionar un gran número de péptidos, entre los cuales puedan ser identificados péptidos bioactivos de interés. Así, Dallas y col., (2013) identificaron más de 300 péptidos en leche humana usando un nanoLC-ESI-QTOF,

comprobando que un gran número de ellos correspondían a péptidos antimicrobianos e inmunomoduladores previamente descritos en otros alimentos y por otros autores. También, se ha utilizado MALDI-TOF y nanoLC-ESI-lineal de TI para analizar el perfil peptidómico de leche de vaca y su proteolisis (Ho y col., 2010). Entre los 202 péptidos identificados, se comprobó que cinco de ellos presentaban actividad, opioide, actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), o actividad inmunomoduladora. Del mismo modo, se identificó en leche comercial mediante el uso de un método optimizado de nano-ESI-IT la formación del péptido opioide β -casomorfina 7 y se cuantificó (14 $\mu\text{g/L}$) (Juan-García y col., 2009).

Entre los productos lácteos comerciales, el queso constituye una de las principales fuentes de péptidos bioactivos debido a la actividad de distintas enzimas proteolíticas, las proteasas y peptidasas naturales de la leche, la acción del cuajo, y las enzimas de las bacterias del cultivo iniciador o de la flora secundaria. López-Expósito y col., (2012) han revisado el papel saludable de los quesos, debido a su notable contenido en péptidos bioactivos, especialmente péptidos antihipertensivos, CPPs, y péptidos opioides. Por ejemplo, los péptidos inhibidores de la ECA, VPP e IPP se encontraron en concentraciones fisiológicas relevantes en varios quesos disponibles comercialmente, la identificación se realizó mediante el uso de TI lineal (Bütikofer y col., 2007 y 2008). Del mismo modo, Ong y Shah (2008) han determinado la liberación de varios péptidos inhibidores de la ECA en quesos Cheddar fabricados con diferentes cultivos iniciadores usando RP-HPLC en conjunción con MALDI-TOF. Por otra parte, los péptidos con actividad inhibidora de la ECA y antihipertensivos fueron detectados por RP-HPLC-ESI-IT en queso Manchego (Gómez-Ruiz y col., 2004a) y en diferentes quesos españoles (Gómez-Ruiz y col., 2006). En una variedad de queso mexicano sin madurar pero fabricado con cepas específicas de bacterias ácido lácticas, también se han identificaron péptidos inhibidores de la ECA a

través del análisis del extracto de agua menor de 3 kDa) por nanoLC-ESI-IT (Torres-Llana y col., 2011). Por otro lado, en el queso semiduro Herrgård se encontraron CPPs de cadena larga analizados por RP-HPLC-ESI-IT y posterior separación por IEX (Ardö y col., 2007; Otte y col., 2007). En cuanto a los péptidos opioides, De Noni y Cattaneo (2010) cuantificaron β -casomorfina 7 en diferentes variedades de queso usando RP-HPLC-ESI-IT y detectaron concentraciones de 0,15 mg/kg en queso Brie.

Las leches fermentadas, yogures y kéfir son otro grupo importante de productos lácteos comerciales que pueden contener péptidos bioactivos en su composición debido a la proteólisis de la proteína de la leche durante la fermentación (Muro Urista y col., 2011). De hecho, Hernández-Ledesma y col., (2005) identificaron tres potentes péptidos inhibidores de la ECA, los péptidos: VPP, NIPPLTQTPV, y RY, en una leche fermentada comercial después de realizar el análisis de RP-HPLC-ESI-IT de ciertas fracciones activas. Además, algunos péptidos identificados mostraron secuencias similares a otros ya descritos con capacidad inhibidora de la ECA, inmunomoduladores y antioxidantes. En otro estudio, Quirós y col., (2005) describieron la presencia de dos péptidos inhibidores de la ECA, PYVRYL y LVYPFTGPIPN, en un kéfir comercial a base de leche caprina después de la identificación de péptidos por MS/MS. Jarmolowska y Krawczuk (2012) detectaron los péptidos opioides β -casomorfina 7, lactoferroxin A, casoxin 6, y casoxin C en dos yogures disponibles en el mercado y en un kéfir. En este caso, se emplearon ensayos de ELISA en lugar de análisis de MS. Por otro lado, la aplicación de microLC-ESI-TOF para el análisis peptidómico de un yogur antihipertensivo demostró, contener además de péptidos inhibidores de la ECA y antihipertensivos, la presencia de otros péptidos bioactivos con diferentes actividades como actividad antioxidante, antibacteriana, opioide o antitrombótica (Kunda y col., 2012).

4.2. Identificación de péptidos tras la digestión gastrointestinal de productos lácteos

Varios autores han empleado la espectrometría de masas para caracterizar los productos formados durante la digestión de diferentes proteínas de leche, como las proteínas bovinas (Dupont y col., 2010a y b, Picariello y col., 2010), proteínas ovinas (Gómez-Ruiz, y col., 2004b), caprinas (Almaas y col., 2011), de burra (Bermeosolo-Bidasolo, y col., 2011), y humana (Hernández-Ledesma y col., 2007). La identificación por MS puede estar dirigida a algunos productos de interés a través de la digestión (epítomos potenciales, búsqueda de secuencias bioactivas, estabilidad de ciertas regiones); o el análisis indirecto destinado a elucidar la cinética de digestión de la proteína para desarrollar y validar finalmente protocolos y modelos de digestión. Algunos autores han utilizado esta identificación específica para evaluar la estabilidad de varios péptidos durante la digestión, por ejemplo, para supervisar la actividad inhibidora de la ECA en queso (Gómez-Ruiz y col., 2004b), o para dar seguimiento a péptidos antioxidantes y con actividad de la ECA generados en la leche humana y en fórmulas para lactantes digeridas *in vitro* con pepsina porcina y pancreatina (Hernández-Ledesma y col., 2007). De Noni y Cattaneo (2010) estudiaron la aparición y estabilidad de β -casomorfina 5 y 7 en los productos lácteos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando pepsina porcina seguida de Corolasa PPTM. Así mismo, ciertas regiones antihipertensivas de β -CN por ejemplo, f (133-138) que resultó ser resistente a la digestión *in vitro*, fueron evaluados por Quirós y col., (2009) mediante el uso de una hidrólisis en dos etapas con pepsina porcina y Corolasa PPTM. Sin embargo, en otros casos se ha descrito cómo los péptidos se pueden hidrolizar durante la digestión gastrointestinal manteniendo su actividad, disminuyéndola o aumentándola. Como ejemplo de este último caso, la secuencia antihipertensiva KLPVPQ, con baja actividad *in vitro*, pero que mostró una mayor actividad después de la digestión *in*

vitro con pancreatina por la pérdida de ácido glutámico en el extremo C-terminal (Maeno y col., 1996).

Otros autores han utilizado técnicas basadas en MS para identificar la formación de CPPs durante la digestión gastrointestinal. Por ejemplo, la resistencia de CPPs a la digestión gastrointestinal *in vitro* cuando se agregaron frutas a las bebida de leche o en bebidas de frutas cuando se utilizaron dos soluciones enzimáticas para la digestión: pepsina porcina y pancreatina biliar (García-Nebot, y col., 2010). Así mismo, Miquel y col., (2006) llevaron a cabo la identificación de CPPs generados en diferentes fórmulas infantiles después de la digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando pepsina porcina, seguido por la adición de pancreatina porcina y extracto de bilis. Además, Adt y col., (2011) estudiaron el contenido de CPPs en el queso Beaufort usando precipitación selectiva antes y después de someter el queso a la digestión con pepsina seguido de incubación con pancreatina. Destacando el aumento de CPPs después de la digestión con enzimas gastrointestinales, donde la mayoría de los péptidos estaban monofosforilados.

El análisis indirecto para caracterizar digeridos gastrointestinales mediante el uso de técnicas basadas en MS también ha sido utilizado por varios autores. El perfil de péptidos de dos quesos noruegos obtenidos antes y después de la digestión gastrointestinal *in vitro* con enzimas humanas, ha sido estudiado por Qureshi y col., (2013) utilizando nanoLC-ESI-QTOF. En este estudio, se realizó la digestión usando un modelo de tres etapas incluyendo la incubación de las muestras en un homogeneizador para imitar el proceso de masticación, seguido por la adición de jugos gástricos y duodenales. Se observó la resistencia de algunos péptidos, aunque otros parecían ser totalmente degradados y desaparecieron después de la digestión. Además, la generación de aminoácidos libres se vio afectada durante este proceso.

La digestión gástrica causó una disminución significativa en el contenido de prolina, considerando que los aminoácidos aromáticos tales como tirosina, fenilalanina y triptófano, los de carga positiva como arginina, lisina y leucina no sufrieron ningún cambio. Por el contrario, la digestión duodenal produjo un aumento significativo en estos aminoácidos. Sánchez-Rivera y col., (2014) estudiaron el peptidoma del queso Valdeón y el de leche descremada en polvo después de dos etapas de digestión *in vitro* mediante la adición de pepsina porcina, seguido por tripsina, quimotripsina, lipasas y sales biliares, utilizando RP-HPLC-ESI-IT. La gran homología que presentaron las digestiones en este estudio sugiere que la digestión gastrointestinal podría aportar una estrecha similitud en el perfil de los productos resultantes cuyas matrices difieren en su estado proteolítico. Sin embargo, con respecto a las secuencias bioactivas, hay excepciones atribuidas a las diferencias de péptidos que son precursores de las diferentes actividades biológicas observadas. Eriksen y col., (2010) utilizaron un nanoLC-ESI-QTOF para comparar la formación de péptidos de las proteínas de suero de leche caprina después de la digestión gástrica estática *in vitro* realizada en dos pasos utilizando jugos duodenales y enzimas porcinas (pepsina y Corolase PPTM). Aunque a nivel de la digestión las proteínas no presentaron gran diferencia, el SDS-PAGE del perfil de péptidos de β -Lg reveló diferencias en las digestiones obtenidas por la acción de las enzimas porcinas y las enzimas humanas realizadas bajo las mismas condiciones. Los patrones de digestión de proteínas para los dos modelos *in vitro* en digestiones estáticas, infantiles y en adultos, han sido evaluados usando nanoLC-ESI-QTOF por Dupont, y col., (2010a). Del mismo modo, la resistencia de péptidos de proteínas de leche obtenidos mediante el uso de un modelo de digestión estática *in vitro* en varios pasos fue estudiado por Picariello y col. (2010), mediante el uso de MALDI-TOF, nanoESI-QTOF, y nanoLC-ESI-QTOF. Las fracciones de CPPs enriquecidos fueron obtenidas con una columna de TiO₂ y se analizaron en este estudio con el fin de aumentar

la cobertura de la secuencia de las proteínas. Además, los autores destacaron la relevancia de ciertas regiones de β -Lg, resistentes a la proteólisis y sus implicaciones en la alergia a la leche de vaca.

Hay algunos estudios realizados *in vivo* para comprender la degradación de las proteínas, y su cinética durante la digestión. Bouzerzour y col., (2012) han realizado un estudio sobre la digestión de una fórmula infantil en lechones, a fin de evaluar la cinética de digestión de proteínas y la liberación de péptidos. La región de β -CN entre los residuos 74 y 91 fue resistente a la proteólisis durante estos experimentos. Estos resultados están de acuerdo con los estudios *in vitro* de la digestión infantil llevada a cabo con diferentes matrices lácteas tales como leche pasteurizada, leche esterilizada y yogur (Dupont, y col., 2010b). Además, algunos autores han caracterizado digeridos humanos después de la ingestión de leche o yogur (Chabance y col., 1998). Mediante degradación de Edman y usando un secuenciador automatizado de fase gaseosa, se han identificado a partir α_{S1} -CN las secuencias f(25-32) y f(143-149). Asimismo, Boutrou y col. (2013) llevaron a cabo un estudio *in vivo* en humanos para evaluar la liberación de péptidos después de la ingestión de caseínas y de proteína de suero. Se identificaron en yeyuno un total de 356 péptidos procedentes de la β -CN y 165 péptidos derivados las proteínas de suero lácteas. El análisis cuantitativo de algunos de los péptidos presentes, como diferentes fragmentos de β -CN incluyendo f(60-66) y f(108-113), sugiere que se producen en cantidad suficiente como para que estos péptidos ejercieran cierta actividad opioide y antihipertensiva, respectivamente.

Con el fin de evaluar el efecto que un péptido de la dieta puede ejercer en el organismo, es necesario que el proceso de digestión que se lleve a cabo sea lo más similar posible a los parámetros fisiológicos que ocurren *in vivo*. En este sentido, Kopf-Bolan y col., (2012) validaron un modelo de digestión *in vitro* de leche pasteurizada mediante RP-

HPLC-ESI-IT por la comparación de los resultados fisiológicos humanos con los datos de los estudios relacionados con el transporte de los péptidos intestinales, la digestión de los triglicéridos emulsionados y la digestibilidad del almidón. En este estudio los resultados fueron coherentes ya que el método desarrollado proporcionó valores de degradación de macronutrientes similares a los encontrados en humanos. En general, en los estudios de digestión estática *in vitro* hay algunos rasgos que resultan comunes. Así, la β -LG y α -La son más resistentes a la digestión que otras proteínas de la leche (Dupont y col., 2010a; Picariello y col., 2010). Además, hay algunas regiones proteicas que parecen ser más resistentes a la digestión como es el caso de aquellas zonas con fragmentos fosforilados (García-Nebot y col., 2010; Hirayama y col., 1992). Del mismo modo, las regiones hidrofóbicas y ricas en prolina resisten la digestión (Hausch y col., 2002), mientras que los aminoácidos neutros y básicos se hidrolizan rápidamente. Algunos de estos dominios ricos en prolina están bien conservados entre las distintas especies, y curiosamente algunas secuencias descritas como bioactivas se encuentran en estas regiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación del hidrolizado de caseína con pepsina de grado alimentario

La hidrólisis de la caseína comercial Promilk 85[®] (Ingredia, Arras Cedex, Francia) se llevó a cabo con pepsina de grado alimentario (Biocatalyst, Nantgarw, Reino Unido) en la empresa Innaves S.A. Para ello, la caseína disuelta al 6% (p/v) se hidrolizó con pepsina utilizando una relación enzima:sustrato de 1:50 (p/p) durante 6 horas a 37°C, añadiendo la enzima al inicio de la reacción y al cabo de 3 horas. La inactivación de la enzima se llevó a cabo por incremento del pH hasta 7,0. El hidrolizado se sometió a un proceso de filtración a través de una malla (1,3 mm) o microfiltración (0.1 μ m). El filtrado, correspondiente al hidrolizado, se sometió a un proceso de atomización para su secado. El contenido proteico del hidrolizado se determinó mediante el método Kjeldahl de acuerdo con la norma de la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1993) y fue del $71.33 \pm 1.55\%$ (p/p). El retenido obtenido mediante filtración tras la hidrólisis enzimática corresponde al subproducto del proceso, y se liofilizó hasta su posterior análisis. Asimismo, el contenido proteico del subproducto se determinó por Kjeldahl y fue del $71,05\% \pm 0.34$ (p/p) cuando se obtuvo por filtración y del $82,75\% \pm 2,0$ (p/p) cuando se obtuvo por microfiltración.

2. Preparación del hidrolizado trípico a partir del subproducto derivado de caseína y enriquecimiento en CPPs mediante precipitación selectiva

Para la preparación de hidrolizados a partir del subproducto de caseína, 10 g del producto seco se resuspendieron en agua Milli-Q y se ajustó el pH a 8,0 con NaOH 5M y se añadió tripsina de grado alimentario (Biocatalyst[®]) utilizando una relación final de enzima:sustrato del 2% p/p. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C durante 2 h manteniendo el pH en un rango de 7,7- 8,5 mediante la adición de NaOH 1M. Después de la hidrólisis el

pH se ajustó a 4,6 con HCl 1M y el material insoluble se eliminó por centrifugación ($12.000 \times g$ durante 10 minutos a 10°C).

Para obtener fracciones enriquecidas en CPPs, los hidrolizados trépticos del subproducto o los digeridos obtenidos tras la simulación de la digestión gastrointestinal se sometieron a un proceso de precipitación selectiva siguiendo el método de Adamson y Reynolds (1995b). Las muestras se ajustaron a pH diferentes (4,0, 6,0 y 8,0) y se adicionó el volumen necesario de una disolución de CaCl_2 10% (p/v) para obtener una relación de 20 mol de CaCl_2 /mol proteína. Se adicionó lentamente el mismo volumen de etanol absoluto 99,8% (v/v) y se mantuvieron en agitación constante. A continuación se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 10°C , el precipitado se lavó con 50% (v/v) de etanol y nuevamente se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 10°C . Finalmente, el precipitado se liofilizó y almacenó a -20°C hasta su análisis.

3. Preparación de hidrolizados de grado alimentario a partir de un aislado de proteínas de suero

El aislado de proteínas de suero (WPI) (PROVON[®], Protein Glanbia Nutritionals, Kilkenny, Irlanda) a 10% (p/v) se hidrolizó con Alcalasa[®] (Novozymes, Araucaria, PR, Brasil), pancreatina (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, Francia) y Flavourzyme[®] (Novozymes) de acuerdo con de la Hoz y col., (2014b). Para optimizar el grado de hidrólisis se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotable (2^2 RCCD) donde las variables independientes fueron el pH y la relación enzima/sustrato y la variable respuesta, el grado de hidrólisis. Las condiciones elegidas fueron pH 8; 1,0% (p/p) (E/S) y 60°C (Alcalasa[®]); pH 8, 4,0% (p/p) (E/S) y 40°C (pancreatina); y pH 6,7, 2,6% (p/p) (E/S) y 55°C (Flavourzyme[®]) para obtener grados de hidrólisis de 21,40% (Alcalasa[®]), 23,73% (pancreatina) y 16,28% (Flavourzyme[®]). La hidrólisis se realizó usando un titulador

automático Mettler-Toledo DL21 pH-stat (Mettler-Toledo, Columbus, OH, EE.UU.). El fraccionamiento de los hidrolizados se realizó mediante un sistema de ultrafiltración Prep/ScaleTM-TFF con cartuchos de corte de peso molecular nominal de 5 kDa (Pellicon® Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Posteriormente las muestras se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4. Preparación del hidrolizado triptico de grado alimentario a partir del concentrado de proteínas de suero enriquecido en β -Lg

Se empleó un concentrado de proteínas de suero (WPC) enriquecido en β -Lg (más del 99.0%) obtenido de Friesland Campina Domo (Zwolle, Holanda). La enzima empleada fue tripsina de grado alimentario (Biocatalyst[®]) y el hidrolizado se preparó en las instalaciones de Innaves, S.A. Para ello, el WPC se resuspendió en agua a una concentración final del 5% (p/v) y se calentó durante 10 minutos a 90°C. Tras la adición de tripsina a una relación enzima:sustrato de 1:20, la hidrólisis tuvo lugar a pH 8,0 y 37°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, la enzima se inactivó por calentamiento a 95°C durante 15 minutos y el hidrolizado se secó por atomización. El contenido en proteína fue del 74.07 ± 0.19 %.

5. Simulación de la digestión gastrointestinal del subproducto de caseína

Varias de las muestras empleadas fueron sometidas a una simulación de la digestión gástrica y duodenal según el método descrito por Jiménez-Saiz y col., (2011). Las enzimas y los reactivos usados en el proceso de la digestión gastrointestinal fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). En la fase gástrica, las muestras se disolvieron en una solución que simula el fluido gástrico con NaCl 0,35 M, se mezclaron con vesículas de fosfatidilcolina (9,58 mg ml⁻¹) y el pH se ajustó a 2,0 con HCl 0,5 M. Las muestras se

precalentaron a 37°C durante 15 minutos y a continuación se digirieron con pepsina (EC 3.4.23.1, 3.640 U/mg proteína) a 182 U/mg de proteína, a 37°C durante 60 minutos. Las digestiones se ajustaron a pH 7,0 por la adición de NaHCO₃ 0,5M para inactivar la enzima. Para la fase duodenal, los digeridos gástricos se reajustaron a pH 6,5 por la adición de HCl, y 0.125 M de sales biliares (mezcla equimolar de glicocolato de sodio y taurocolato de sodio) y CaCl₂ 1M (7,6 mM concentración final). Las muestras se precalentaron a 37°C durante 15 minutos y posteriormente se adicionaron las enzimas: lipasa pancreática porcina (EC 232-619-9, tipo VI-S, 47,900 U/mg de proteína) a 24,75 U/mg de proteína, colipasa pancreática porcina (EC 259-490-1) a 1:895 p/p de proteína, tripsina pancreática bovina (EC 232-650-8, tipo I 10.100 U/mg de proteína) a 34,5 U/mg de proteína y α -quimotripsina pancreática bovina (EC 232-671-2; tipo I-S; 55 U/mg de proteína) a 0,44 U/mg de proteína, se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. La digestión se detuvo calentando a 80°C durante 5 minutos.

6. Síntesis de péptidos

Los fragmentos de α_{s1} -caseína ⁹⁰RYLGY⁹⁴, ¹⁴³AYFYPEL¹⁴⁹, y ¹⁴⁴YFYPEL¹⁴⁹ se sintetizaron en nuestro laboratorio mediante síntesis peptídica Fmoc en fase sólida convencional con un sintetizador de péptidos 433A (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Su pureza (>90%) se verificó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y espectrometría de masas (RP-HPLC-MS). El fragmento de α_{s2} -caseína ⁸⁹YQKFPQY⁹⁵ fue sintetizado por Genscript Corporation (Piscataway, Nueva York, EE.UU.). El péptido lunasina con una pureza superior al 95% fue sintetizado por Chengdu Kaijie Biopharm Co., Ltd (Chengdu, Sichuan, República Popular de China).

7. Caracterización de caseína y del subproducto de caseína

La humedad de la caseína comercial y del subproducto derivado de caseína se determinó mediante secado en un horno a 100-105°C durante 3 h (IDF, 1964). La composición mineral en concreto de Ca, P, K, Mg y Na se determinó mediante espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP) usando un Perkin Elmer Optima 4300 DV (Waltham, MA, EE.UU.). Los análisis se realizaron por triplicado. El análisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo utilizando el test de intervalos de confianza al 95%.

También se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). Para ello las muestras se disolvieron a 1 mg/ml en tampón 10 mM Tris-HCl conteniendo 2% (p/v) de SDS y 5% (v/v) de 2-β-mercaptoetanol y se calentaron a 95°C durante 4 minutos. Las muestras se analizaron por duplicado en geles comerciales Criterion XT 12% Bis-Tris (Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.), la separación electroforética se realizó a 150V usando el buffer XT-MES (Bio-Rad), y una cubeta para electroforesis (Bio-Rad), finalmente los geles fueron teñidos con Coomassie Bio-Safe G-250 (Bio-Rad).

8. Análisis de caseinofosfopéptidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

Los CPPs se identificaron mediante RP-HPLC-MS/MS. La separación se realizó en un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) conectado en línea a una trampa de iones Esquire-LC (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y equipado con una fuente de ionización por electrospray. Se empleó una columna XBridge™ BEH 300 C18 (4,6 × 250 mm, 5 μm, Waters Corp). El volumen de inyección

fue de 50 μ l, la velocidad de flujo a la salida del detector ultravioleta (214 nm) fue de 0,8 ml/minuto y se dividió en una proporción 1:40 para dar un flujo final aproximado de 20 μ l/minuto hacia el nebulizador del espectrómetro de masas. El equipo utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de secado (60 psi, 8 l/min, 350°C) y helio a una presión estimada de 5 bares. Las muestras liofilizadas (2,5 mg) se disolvieron en 1 ml de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich). La fase móvil A fue una mezcla de agua Milli-Q/TFA (1000:0,37, v/v) y la fase móvil B contenía acetonitrilo de grado HPLC/TFA (1000:0,27, v/v). El gradiente de elución fue de 0% a 60% de fase móvil B en A durante 90 minutos, y después el porcentaje de fase móvil B aumentó a 90% durante 5 minutos y se mantuvo constante en 90% durante 5 minutos. Los espectros de masas se obtuvieron en un intervalo entre 200 y 2500 masa/carga (m/z). Para los análisis de espectrometría de masas en tándem se utilizó el valor medio de 5 espectros. El límite de intensidad para llevar a cabo los análisis de espectrometría de masas en tándem fue de 10.000 unidades arbitrarias. Los iones precursores se aislaron con un intervalo de 4 m/z y se fragmentaron con una rampa de voltaje de 0,3 a 2 V. Los datos espectrales de m/z se procesaron y se transformaron a valores de masa utilizando el programa Data AnalysisTM (versión 4.0, Bruker Daltonik). Para procesar los espectros de masas en tándem y llevar a cabo la secuenciación de los péptidos se empleó el programa BioTools (versión 3.2, Bruker Daltonik). La semi-cuantificación de los CPPs se realizó mediante la integración del área de pico correspondiente a la extracción del ión molecular de los péptidos correspondientes.

9. Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados de hidrolizados enzimáticos de proteínas de suero

Los péptidos con capacidad de unión a Fe se aislaron a partir de los hidrolizados de WPI con diferentes enzimas (apartado 2.3) mediante el uso de IMAC-Fe(III) según la metodología descrita por Lv y col. (2009), con algunas modificaciones (de la Hoz y col.,

2014b). Para ello, 10 ml de resina Sepharose High Performance (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) se cargaron con una solución de Fe (III) (5 ml de 0,2 M FeCl_3). La columna se lavó con agua Milli-Q y posteriormente con tampón acetato de sodio 50 mM, pH 3,6 para eliminar el hierro no unido, el unido inespecífico y para equilibrar la columna. Se inyectaron 3 ml de las fracciones menores de 5 kDa (20 mg de proteína/ml) a temperatura ambiente y los péptidos unidos se eluyeron con un tampón de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,1 M) pH 4,5 a un flujo de 2 ml/minuto. La elución se monitorizó a 280 nm, se recogieron las fracciones, se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. El aislamiento de los péptidos unidos a hierro IMAC-Fe(III), se realizó en el Instituto de Tecnología de Alimentos (CCQA, ITAL) de la Universidad de Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brasil.

10. Análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de hidrolizados de proteínas de suero

La fracción menor de 5 kDa obtenida a partir de los hidrolizados de WPI con distintas enzimas de grado alimentario y las correspondientes fracciones obtenidas mediante IMAC-Fe(III) se identificaron mediante RP-HPLC-MS/MS. Todas las condiciones corresponden a las descritas anteriormente pero se utilizó una columna Hi-Pore C_{18} (250 mm \times 4,6 mm y de 5 μm de tamaño de partícula) (Bio-Rad). La concentración de proteína a la que se inyectaron las muestras fue de 2 mg/ml para las fracciones menores de 5 kDa y 1 mg/ml para las fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad. Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de disolvente B en A (con la misma composición que la descrita anteriormente) salvo que en la etapa inicial del gradiente fue del 0% a 45% en 60 minutos. Las muestras se analizaron empleando dos intervalos de m/z : 100-1.500 y 100-3.000.

11. Determinación del perfil de aminoácidos de hidrolizados de proteínas de suero

Previamente a la determinación del perfil de aminoácidos de la fracción menor de 5 kDa de los hidrolizados de WPI y de las fracciones obtenida por IMAC-Fe(III), las muestras fueron pretratadas mediante el uso de extracción en fase sólida de tipo aniónico mixto. Las muestras se suspendieron en 2% de NH_4OH (v/v), se trataron con cartuchos Bond Elut PAX® (Waters Corp, Santa Clara, CA, EE.UU.) y se eluyeron secuencialmente con metanol y ácido fórmico al 5% (v/v de metanol). Posteriormente, las muestras, a las que se incorporó norleucina, como patrón interno, se sometieron a hidrólisis ácida con HCl 6 M a 110°C durante 21 h (en atmósfera controlada). Los aminoácidos se separaron por cromatografía iónica de intercambio catiónico con derivatización post-columna con ninhidrina y la cuantificación se determinó por colorimetría a dos longitudes de onda de forma simultánea, 570 nm y 440 nm, mediante el uso de un analizador de aminoácidos Biochrom 30 (Amersham-Pharmacia Biotech), de acuerdo a la metodología descrita por Spackman y col., (1958).

12. Cultivo de células epiteliales intestinales secretoras de mucinas (HT29-MTX)

Se utilizó la línea celular HT29-MTX derivada de adenocarcinoma de colon humano, con capacidad de secreción de mucinas donada por la Dra. Thécla Lesuffleur (INSERM UMR S 938, París, Francia). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 10 ml/ de penicilina-estreptomicina a 37°C , en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Los pases semanales se realizaron empleando tripsina/EDTA 0,05% (todos los reactivos eran de Gibco, Paisley, Reino Unido). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con una densidad de 5×10^5 células por pocillo. La línea celular se

utilizó entre los pases 12 y 22. Los experimentos se realizaron 21 días después de confluencia. Desde 24 horas antes del ensayo se trabajó con medio de cultivo sin suero ni antibiótico para eliminar la interferencia de proteínas u hormonas. El día del ensayo, se retiró el medio, se lavó dos veces la monocapa celular con tampón fosfato salino (PBS) y se adicionó el medio con los péptidos en concentración 0,05, 0,1 y 0,5 mM, incubándose a 37°C durante tiempos comprendidos entre las 2 y 24 horas. En los pocillos control se añadió únicamente el medio de cultivo. A los tiempos seleccionados, se recogieron los sobrenadantes que se mantuvieron congelados a -80°C hasta su análisis. La extracción y posterior purificación del ARN celular se llevó a cabo con el kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

13. Ensayo de lectina conjugada a enzima

La determinación cuantitativa de mucinas totales se realizó mediante un ensayo de lectina conjugada a enzima (Enzyme-Linked Lectin Assay; ELLA). Este ensayo está basado en el empleo de aglutinina de germen de trigo, que ha mostrado una fuerte reactividad frente a azúcares específicos presentes en las mucinas secretadas por las células caliciformes. El contenido total de glicoproteínas en las muestras estudiadas se obtuvo mediante interpolación en una curva estándar construida a partir de mucina gástrica porcina comercial (Sigma). El tapizado de la placa de poliestireno de 96 pocillos se realizó con las muestras de la recta de calibrado y con las muestras a ensayar disueltas en buffer carbonato sódico (0,5 M, pH 9,6), dejando la placa en incubación toda la noche a 4°C. A continuación, se realizó el bloqueo con seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) al 2% durante 1 hora a 37°C. Se añadió aglutinina de germen de trigo biotinilada (Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido) disuelta en PBS-Tween-BSA (1:1000), y las muestras se incubaron 1 hora a 37°C. Posteriormente, para amplificar la señal se añadió el complejo

avidina-peroxidasa (Vector laboratories) en PBS-Tween-BSA (1:50000). La determinación colorimétrica se llevó a cabo mediante lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Multiskan Ascent (Labsystems, Barcelona, España) utilizando una disolución de o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Los datos de cada muestra ensayada se expresaron como porcentaje de secreción de glicoproteína frente a su muestra control en el mismo tiempo y ensayo celular, tal como han descrito Martínez-Maqueda y col., (2012).

14. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a tiempo real (qRT-PCR)

La amplificación de la qRT-PCR se llevó a cabo en un equipo Lightcycler 480 (Roche, Mannheim, Alemania) y medida de la fluorescencia a tiempo real, empleando SYBR Green como fluoróforo. El aislamiento del ARN total del cultivo celular se realizó con el kit Nucleospin[®] RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Se obtuvo el ADNc a partir de 375 ng de ARN mediante el uso de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como cebadores de los genes diana y referencia se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos mostradas en la **Tabla 6**.

Se estudió cada muestra de ADNc por triplicado en placas de 384 pocillos. Cada tubo de reacción contenía 5 µl de 2× SYBR Green real-time PCR Master Mix (Roche), 0,25 µl de cada uno de los cebadores específicos de un gen a una concentración de 10 µM, 0,27 µl de ADNc y 4,23 µL de agua. La amplificación se inició a 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 10 segundos y 72°C durante 10 segundos. Se utilizaron controles para confirmar la ausencia de la formación de dímeros de

oligonucleótidos (pocillos sin ADNc) y para verificar que no había contaminación por ADN (pocillo con muestra inicial de ARN sin transcripción inversa). Se comprobó que todos los ensayos amplificaron un único producto mediante el análisis de las curvas de fusión. Para calcular la eficiencia ($E=10^{-1/\text{pendiente}}$) se representó una curva con los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos de la amplificación de cantidades conocidas de ADNc.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas como cebadores para los genes diana (MUC5AC) y referencia (ciclofilina y β -actina) para la PCR con transcripción inversa a tiempo real

Gen	Pares de bases	Secuencia	Referencia
MUC5AC	240	5'-CGACCTGTGCTGTGTACCAT-3' (2870-2889)	Zoghbi y col., 2006
(Aj001402)		5'-CCACCTCGGTGTAGCTGAA-3' (3109-3091)	
Ciclofilina	165	5'-TCCTAAAGCATACGGGTCTGGCAT-3' (280-304)	Zoghbi y col., 2006
(Y00052)		5'-CGCTCCATGGCCTCCACAATATTCA-3' (445-421)	
β -Actina	197	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3' (879-896)	Tai y col., 2008
(NM_001101)		5'-GCAATGATCTTGATCTTCATTGTG-3' (1076-1053)	

Los valores de expresión relativa para el gen diana se determinaron utilizando el método comparativo de ciclos umbrales ($\Delta\Delta C_t$). Se verificaron los genes que codifican la ciclofilina y la β -actina humanas como genes de referencia. Se seleccionó el gen de la ciclofilina para el cálculo de los C_t debido a que había mostrado previamente ser estable bajo las diferentes condiciones utilizadas. Los resultados de expresión de las condiciones estudiadas fueron normalizados con base a aquellos valores de expresión obtenidos para

los pocillos control de ensayo (células sin tratar). Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

Los datos se trataron mediante un análisis de la varianza de dos vías, seguido por el test de Bonferroni. Para una mejor comparación del efecto de las distintas concentraciones, los datos también se analizaron para cada tiempo mediante un análisis de la varianza de una vía, seguido por el test de Newman-Keuls. Las diferencias significativas entre los valores medios y los pocillos control se expresaron de la siguiente forma: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) o $P < 0.001$ (***). Se utilizó el programa GraphPad Prism 4 para el análisis estadístico de los datos.

15. Análisis cuantitativo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem del hidrolizado de caseína

Para el análisis del hidrolizado de caseína se empleó la columna Mediterranea Sea₁₈ (150 mm × 2.1 mm) (Teknokroma, Barcelona, España). Las condiciones y composición de los solventes fue la indicada previamente, salvo que el gradiente empleado para la elución fue del 0% al 45% de solvente B en A en 120 minutos y la elución se llevó a cabo a un flujo de 0,2 ml/min dirigiendo todo el flujo a la salida del cromatógrafo hacia el nebulizador. El umbral de señal para llevar a cabo la espectrometría de masas en tándem fue de 50.000. Los espectros fueron adquiridos en un intervalo m/z de 100-3000 Da.

La cuantificación de los péptidos de interés se llevó a cabo mediante el empleo de curvas de calibración externas con los correspondientes péptidos sintéticos y representando el área bajo la curva de la señal obtenida mediante el análisis de espectrometría de masas con respecto a la concentración del péptido. La representación del área bajo la curva se hizo empleando la intensidad medida para el péptido y para sus aductos de sodio y potasio.

Cada curva de calibrado constaba de cinco puntos, correspondientes a cinco concentraciones diferentes de los péptidos. Se estimó la regresión lineal de las curvas de calibrado ($y = a + bx$). Las curvas obtenidas fueron las siguientes: (a) $y = 1,40 \times 10^6 x - 1,92 \times 10^6$ ($R^2 = 0,997$) para AYFYPEL; (b) $y = 2,14 \times 10^6 x - 1,27 \times 10^6$ ($R^2 = 0,998$) para YFYPEL; (c) $y = 6,59 \times 10^6 x + 2,49 \times 10^6$ ($R^2 = 0,995$) para RYLGY, y (d) $y = 2,21 \times 10^6 x - 1,75 \times 10^6$ ($R^2 = 0,999$) para YQKFPQY. Para estudiar la estabilidad de los péptidos durante los experimentos, los sobrenadantes celulares también se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS utilizando la columna de fase inversa Mediterranea Sea₁₈ y las condiciones descritas en este apartado.

16. Ensayo de ulcerogénesis experimental

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) adultos machos de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 250 y 350 g, que se obtuvieron del Centro de Experimentación Animal (CEMIB) de la Universidad de Campinas (São Paulo, Brasil). Antes de los experimentos, los animales se mantuvieron durante 7 días a 20°C bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con agua y alimentación *ad libitum* de una dieta estándar comercial (Nuvital Nutrients, Curitiba, Brasil). Doce horas antes del experimento, los animales se mantuvieron en ayunas con disponibilidad de agua *ad libitum*. El efecto protector sobre la mucosa del estómago se estudió empleando un modelo de ulcerogénesis con etanol absoluto (Robert, 1979). El protocolo empleado fue aprobado previamente por el Comité Ético para la Investigación Animal de la Universidad de Campinas de acuerdo a los principios éticos de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor relativo a la experimentación animal.

Los animales se dividieron en grupos de seis individuos. Para los grupos correspondientes a los controles negativo y positivo, se administró una solución de NaCl

(0,9% p/v) a una dosis de 10 ml/kg de peso corporal del animal y un compuesto antiulcerativo, la carbenoxolona (Sigma) a una dosis de 200 mg/kg peso corporal, respectivamente. Las muestras de hidrolizados se administraron por intubación gástrica a tres concentraciones diferentes de 100, 300 y 1000 mg/kg de peso corporal. Pasada una hora tras la ingestión de la muestra o las soluciones control, se administró 1 ml de etanol absoluto a cada rata, que fue sacrificada una hora después. Se extrajo el estómago y se lavó con solución salina para el posterior análisis de las lesiones ulcerativas.

Las lesiones ulcerativas se evaluaron por inspección visual de la mucosa gástrica del estómago extraído del animal. De acuerdo con Gamberini y col. (1991), el índice de lesiones ulcerativas (ILU) de cada animal se calcula sumando las notas obtenidas tras el análisis de los siguientes parámetros: pérdida de morfología (1 punto), decoloración de la mucosa (1 punto), edema (1 punto), hemorragia (1 punto), presencia de petequias de un tamaño inferior a 9 mm (2 puntos), petequias mayores de 10 mm (3 puntos), úlceras de tamaño hasta 1 mm (número de úlceras $n \times 2$ puntos), úlceras mayores a 1 mm ($n \times 3$ puntos).

El porcentaje de disminución del ILU se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ disminución ILU} = \frac{(\text{media ILU control negativo} - \text{media ILU muestra})}{\text{media ILU control negativo}} \times 100.$$

La dosis efectiva (DE_{50}), definida como la concentración de muestra que produce una disminución del 50% en el ILU, se estimó empleando una ecuación de regresión logarítmica para los valores de ILU obtenidos a las dosis empleadas de 100, 300 y 1000 mg/kg.

La contribución de los compuestos sulfhidrilo en la protección sobre la mucosa del estómago de las ratas frente a la acción ulcerogénica del etanol absoluto se evaluó empleando el reactivo N-etilmaleimida (NEM). Este reactivo tiene la capacidad de bloquear, vía alquilación, los grupos sulfhidrilo (Szabo y col., 1983). El protocolo experimental fue análogo al descrito previamente, con la diferencia que 30 minutos antes de la administración intra-gástrica de la solución salina (control negativo) o de los hidrolizados (de caseína a concentración de 500 mg/kg peso corporal y de proteína de suero a concentración de 300 mg/kg peso corporal), las ratas recibieron, por inyección subcutánea, una solución de NEM a la dosis de 10 mg/kg de peso corporal.

Los datos se trataron mediante un ANOVA de una vía, seguido por el test de Tukey y se expresaron como valor medio \pm desviación estándar de los diferentes experimentos realizados. En ocasiones, para una mejor comparación de los resultados obtenidos se han analizado mediante un análisis de varianza de una vía, seguido por el test de Newman-Keuls. Se utilizó el programa GraphPad Prisma 4 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.) para encontrar diferencias significativas con valores de $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) o $P < 0,001$ (***).

17. Simulación de la digestión gastrointestinal de la lunasina en presencia del isoinhibidor1 de Bowman-Birk

Para conocer el comportamiento de la lunasina durante el proceso de la digestión gastrointestinal en presencia del isoinhibidor 1 de Bowman-Birk (IBB1) se prepararon mezclas de lunasina sintetizada químicamente con IBB1 purificado a partir de soja comercial en las siguientes proporciones: 1:0, 1:1 y 1:2 (p:p) y lunasina en presencia de IBB1 inactivo en proporción 1:2 (p:p). Estas mezclas se sometieron a un proceso de

simulación gastrointestinal de acuerdo con el método de Jiménez-Saiz y col., (2011) descrito anteriormente.

El IBB1 se obtuvo del laboratorio del Dr. Alfonso Clemente (Estación Experimental del Zaidín, CSIC). Este había sido purificado a partir de soja comercial mediante cromatografía de intercambio catiónico siguiendo la metodología descrita por Arques y col., (2014). Para obtener la forma inactiva del isoinhibidor IBB1, se llevó a cabo la reducción de enlaces disulfuro y su posterior alquilación. Para ello, se disolvieron 10 mg de IBB1 en Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) y se redujo con 100 μ L de ditioneitol (DTT) 0,5 M, a 100°C durante 2 minutos. La posterior alquilación se realizó con 500 μ L de yodoacetamida 0,25 M a 50°C durante 15 minutos en oscuridad. Con el fin de eliminar los residuos de DTT y de yodoacetamida, las muestras se dializaron con agua destilada y se liofilizaron.

Se evaluaron las actividades inhibitoras de tripsina y quimotripsina del IBB1 del mismo tras el tratamiento de reducción/alquilación. La actividad inhibitora de tripsina se midió usando un ensayo cuantitativo con N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), como sustrato específico, utilizando Tris-50 mM pH 7,5 como solución buffer. Una unidad inhibitora de tripsina se define como aquella que proporciona una reducción de 0,01 unidades en la absorbancia a 410 nm, en relación a la reacción control de tripsina, en un volumen definido de 10 ml durante 10 minutos (Domoney y Welham, 1992). La actividad inhibitora de quimotripsina se midió usando éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTTEE) como sustrato específico. Una unidad inhibitora de quimotripsina se define como aquella que proporciona una reducción de 0,01 unidades en la absorbancia a 256 nm, con respecto a la reacción control de quimotripsina, en un volumen de ensayo definido de 10 ml en 5 minutos, según lo descrito por Clemente y col., (2004). Las actividades inhibitoras

de tripsina y quimotripsina se expresaron como unidades inhibidoras por mg de proteína, empleando estos datos para evaluar la inactivación química del IBB1.

18. Análisis de los digeridos gastrointestinales de lunasina mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem

Los digeridos gastrointestinales de lunasina y de lunasina en presencia de IBB1 se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS con el fin de identificar los péptidos formados durante la digestión. Asimismo, en este análisis se llevó a cabo la cuantificación de la lunasina sin degradar en los digeridos. Los análisis se realizaron como se describe en el apartado 2.15, es decir, con una columna Mediterranea Sea₁₈ (150 mm × 2.1 mm) (Teknokroma) y un flujo de 0,2 ml/min, salvo que el gradiente empleado para la elución fue del 0% al 70% de solvente B en A en 75 minutos. Cada muestra se analizó por duplicado y los espectros fueron adquiridos en un intervalo m/z de 200-3000 Da.

Para la determinación cuantitativa de la lunasina, se utilizó una recta de calibrado preparada con lunasina sintetizada químicamente a diferentes concentraciones entre 0,125 hasta 1,5 mg/ml. Tras la representación del área bajo la curva correspondiente a la extracción del ión molecular de la lunasina frente a la concentración de péptidos, se estimó la regresión lineal de las curvas de calibrado ($y = a + bx$). La curva obtenida fue la siguiente: $y = 2 \times 10^9 x - 4 \times 10^8$ ($R^2 = 0,992$).

19. Ensayo de viabilidad celular de células HT-29 y Caco-2

Las líneas HT29 y Caco 2 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano se obtuvieron de la colección de cultivos tipo americano (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.). Las células se sembraron en medio McCoy's (Lonza Group Ltd., Basilea, Suiza) y en

medio Dulbecco's modified Eagle (DMEM, Sigma Chemical), respectivamente, suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, BioWest, Nuailé, Francia), y 1% de solución (v/v) de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (BioWest). En el caso de las células Caco-2, el medio DMEM también fue suplementado con 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales (Lonza Group Ltd.). Dichas líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Para evaluar el efecto de los digeridos de la lunasina sobre la viabilidad celular se empleó un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por deshidrogenasas mitocondriales de las células viables, dando un producto de formazano azul cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente. Las células HT-29 y Caco-2 se sembraron en placas de 48 pocillos (VWR International, Radnor, PA, EE.UU.) a una densidad de 7×10^4 células/cm², y se incubaron durante 24 horas. Tras este tiempo, se añadieron los digeridos obtenidos al final de la digestión gastrointestinal a tres concentraciones de proteína total (0,3; 0,2 y 0,1 mg/ml) y las células fueron incubadas durante otras 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS (Lonza Group, Ltd) y se añadió la solución de MTT (concentración final 0,5 mg/ml) a cada pocillo, incubándose las células a 37°C durante 2 horas. El sobrenadante se aspiró y los cristales insolubles de formazano formados se disolvieron en una mezcla de dimetilsulfóxido:etanol (1:1 v:v), midiéndose la absorbancia a 570 nm en un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de células viables en comparación con el control, considerado como 100%, y como valor de IC₅₀ o concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de células viables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Péptidos lácteos que favorecen la absorción de minerales

1.1. Formación de caseinofosfopéptidos a partir de un subproducto industrial de caseína mediante hidrólisis trípica vs simulación de la digestión gastrointestinal

En este apartado se plantea el aprovechamiento de un subproducto industrial generado durante la fabricación de un hidrolizado de caseína con propiedades antihipertensivas (Contreras y col., 2011). Este subproducto suponía aproximadamente un 30% del rendimiento en peso seco durante la producción del hidrolizado. Los estudios iniciales de caracterización del subproducto ponían de manifiesto su alto contenido en fósforo, por lo que se planteó que podría ser utilizado como sustrato para la obtención de CPPs. Se ha descrito que estas regiones fosforiladas derivadas de las caseínas lácteas pueden favorecer la solubilidad de los minerales de la dieta a nivel intestinal, mejorando, así, la biodisponibilidad de los mismos. Por tanto, la utilización de este subproducto para la obtención de CPPs, se encuadraría no solo en el desarrollo de nuevos ingredientes con efectos beneficiosos para la salud, sino también en el concepto de producción sostenible de alimentos y el aprovechamiento de subproductos, que genera un gran interés a nivel científico e industrial.

Por ello, a partir del subproducto de caseína, se obtuvieron los CPPs mediante hidrólisis con tripsina, y se identificaron por RP-HPLC-MS/MS tras la concentración de los mismos por precipitación selectiva con CaCl_2 y etanol, a tres valores de pH (4,0, 6,0 y 8,0). Además, se investigó la formación de CPPs tras la simulación de la digestión gastrointestinal del subproducto.

1.1.1. Caracterización de la caseína comercial, el subproducto de caseína y los productos de hidrólisis

La **Tabla 7** muestra el contenido de proteína, humedad y minerales (Ca, P, K, Mg, Na e Fe) de la caseína comercial y del subproducto derivado de ella. Los contenidos de la caseína comercial determinados fueron similares a los proporcionados por el fabricante. El contenido de proteína fue más alto en la caseína comercial que en el subproducto derivado de ella, debido a la incorporación de sales durante el proceso de hidrólisis industrial. Todos los valores de minerales mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la caseína comercial y su subproducto. El contenido en potasio fue mayor en el subproducto ya que durante el proceso de hidrólisis se adiciona hidróxido potásico de grado alimentario para ajustar el pH, mientras que los contenidos de Ca, P, Mg, y Na fueron mayores en la caseína comercial. La pérdida parcial de estos minerales en el subproducto probablemente se debe a que las especies libres permanecen en la fracción soluble durante el proceso de filtración, que es separada y constituye el producto de la hidrólisis (hidrolizado con actividad antihipertensiva). Aunque el contenido de fósforo expresado como porcentaje del peso seco es mayor en la caseína que en el subproducto, cuando se expresa como porcentaje respecto al contenido en proteína, ambos valores prácticamente se igualan. Estos resultados permiten considerar que el subproducto derivado de la caseína podría ser utilizado como una fuente adecuada para la obtención de CPPs. Por otra parte, es lógico que las regiones fosforiladas de las caseínas estén formando parte del subproducto, ya que se ha descrito la resistencia de estas regiones a la hidrólisis enzimática (Sánchez-Rivera y col., 2014).

La **Figura 6** muestra la separación electroforética mediante PAGE-SDS de la caseína comercial, el subproducto derivado, y los productos de la hidrólisis con tripsina durante 120 minutos y tras el proceso de simulación de la digestión gastrointestinal. En la caseína

Tabla 7. Humedad, proteína y contenido mineral de la caseína y del subproducto industrial derivado de caseína (expresado como % p/p).

Componente	Caseína	Subproducto derivado de caseína
Humedad	5.022 ± 0.010	4.999 ± 0.020
Proteína	79.960 ± 0.152	71.052 ± 0.339*
Ca	2.506 ± 0.437	0.418 ± 0.027*
P	1.144 ± 0.030	0.788 ± 0.040*
K	0.362 ± 0.014	0.478 ± 0.034*
Mg	0.092 ± 0.003	0.016 ± 0.001*
Na	0.066 ± 0.004	0.022 ± 0.001*

*Indica diferencias significativas ($P < 0,05$). Datos expresados en media \pm y desviación estándar ($n=3$)

comercial se observan bandas electroforéticas intensas correspondientes a las caseínas, aunque también se observaron otras bandas, de menor intensidad, correspondientes a las proteínas de suero β -Lg y α -La (calle 2). En el subproducto derivado de caseína, se observaron las bandas proteicas correspondientes a las proteínas α_{s1} -, α_{s2} - y β -CN, así como otras bandas intensas de menor peso molecular que pueden corresponder a fragmentos de caseína parcialmente hidrolizada por la acción de la pepsina durante la producción del hidrolizado antihipertensivo (calle 3). Cuando el subproducto derivado de caseína se sometió a hidrólisis con tripsina, se observaron pequeñas cantidades de α_{s1} - y β -CN intacta y caseína parcialmente hidrolizada (calle 4). Sin embargo, no se observaron otras fracciones de caseína, lo que indica que son hidrolizadas. Se observaron resultados similares en el sub-producto sometido a simulación de la digestión gastrointestinal (calle 5) aunque no se detectó caseína intacta. Estos resultados se confirmaron mediante análisis por RP-HPLC.

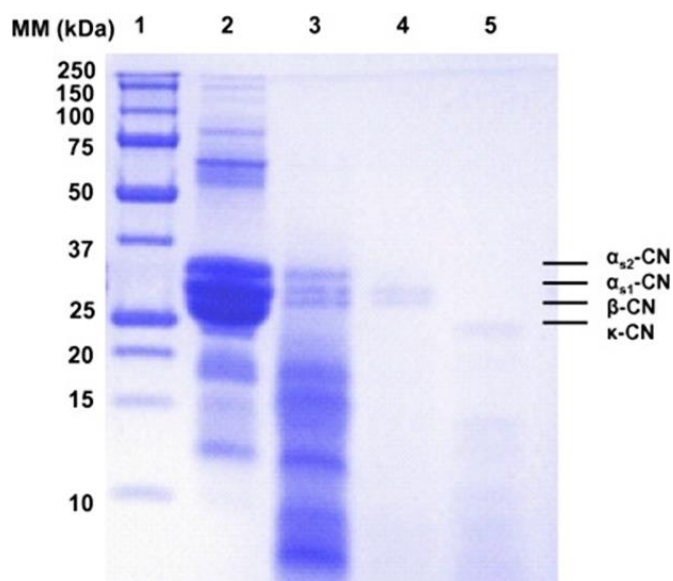


Figura 6. PAGE-SDS de la caseína comercial, el subproducto derivado de caseína, y los productos de su hidrólisis con tripsina y de la simulación de la digestión gastrointestinal. Calles: 1, marcador de pesos moleculares; 2, caseína comercial; 3, subproducto derivado de caseína; 4, subproducto derivado de caseína hidrolizado con tripsina durante 120 min; 5, subproducto derivado de caseína sometido a simulación de la digestión gastrointestinal.

1.1.2. Formación de CPPs a partir del subproducto de caseína mediante hidrólisis con tripsina

El subproducto de caseína obtenido se sometió a un primer análisis mediante RP-HPLC-MS/MS tras el proceso de precipitación selectiva, con el fin de identificar los CPPs presentes en el mismo. Sin embargo, en estos análisis preliminares no se detectaron secuencias fosforiladas probablemente, porque los residuos de serina fosforilada se encontraban formando parte de péptidos de elevado peso molecular o de caseína sin hidrolizar o parcialmente hidrolizada. Por ello, el subproducto derivado de caseína se sometió a un proceso de hidrólisis con tripsina durante 30, 60 y 120 min y a continuación al proceso de precipitación selectiva a pH 4,0, 6,0 y 8,0 con el fin de cubrir tanto la región

ácida como básica, obteniéndose nueve hidrolizados tripticos diferentes, que se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS. A modo de ejemplo, se muestra en la **Figura 7** el perfil cromatográfico con detección ultravioleta (UV) del hidrolizado de tripsina a 120 min y precipitado a pH 8,0. A partir de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas se pudieron identificar un total de 44 CPPs, de los cuales, 13 procedían de α_{s1} -CN, 11 de α_{s2} -CN, 18 de β -CN, y dos de κ -CN (**Tabla 8**). Cabe destacar que 13 de los 44 CPPs identificados contenían la secuencia característica de los CPPs, SpSpSpEE, que representa el sitio de unión para los minerales (FitzGerald, 1998). Concretamente los péptidos α_{s1} -CN f(61-79), α_{s2} -CN f(1-20), α_{s2} -CN f(46-70), β -CN f(1-25) y otros péptidos relacionados contenían esta secuencia característica altamente polar y de carácter ácido. Estos péptidos fueron identificados en todos los hidrolizados, con la excepción del péptido α_{s1} -CN f(61-79)5P, que sólo se identificó en los hidrolizados precipitados a pH 8,0. Cabe destacar que sólo se identificaron dos CPPs derivados de κ -CN, lo que puede deberse a su bajo contenido en leche de vaca y al diferente grado de fosforilación descrito para esta proteína (Caroli y col., 2009).

Los péptidos identificados presentaban en el extremo C-terminal Gln, Lys, Arg, Asn, Glu, Ile, Ser, Asp, Leu, Tyr, Thr y Phe. Lo que indica que algunos de los lugares de corte no corresponden a la especificidad de la tripsina, que puede ser debido a la acción de quimotripsina y carboxipeptidasas presentes en la tripsina comercial de grado alimentario o que algunos lugares de corte son debidos a la acción de la pepsina, la enzima empleada para la producción del hidrolizado antihipertensivo. Estos resultados están de acuerdo con los observados previamente por Adamson y Reynolds (1995a) que observó otras actividades enzimáticas en la hidrólisis caseinato sódico con tripsina.

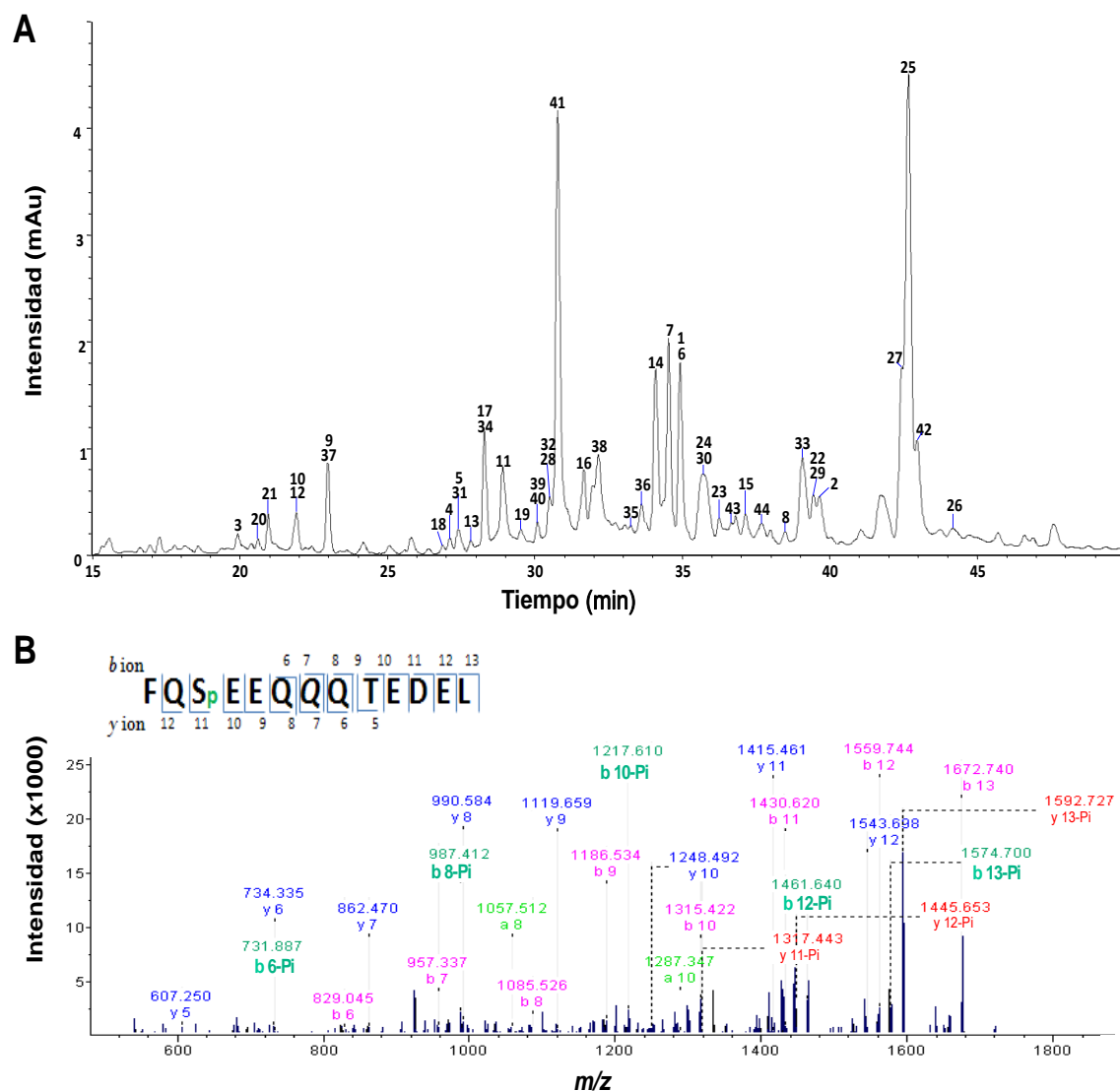


Figura 7. (A) Cromatograma con detección UV obtenido mediante RP-HPLC correspondiente a la hidrólisis del subproducto de caseína durante 120 min con precipitación selectiva a pH 8,0 (B) espectro de MS en tándem del ión con carga (+1) y m/z 1690,7. La secuencia del péptido y los iones generados tras su fragmentación se muestran en el espectro.

Tabla 8. Caseinofosfopéptidos identificados por RP-HPLC-MS/MS en el subproducto derivado de caseína sometido a hidrólisis con tripsina.

Nº	Péptido	Secuencia de aminoácidos	Masa observada	Masa calculada	Ion m/z (carga)
1	α_{s1} -CN f(28-42)1P	FPEVFGKEKVNEL Sp K	1828.9	1829.8	1829.9(+1)
2	α_{s1} -CN f(38-48)1P	NEL Sp KDIGSES	1258.5	1257.5	1259.5(+1)
3	α_{s1} -CN f(43-52)2P	DIG SpESp TEDQ	1239.4	1239.3	1240.4(+1)
4	α_{s1} -CN f(43-55)2P	DIG SpESp TEDQAME	1570.6	1570.4	1571.6(+1)
5	α_{s1} -CN f(43-56)2P	DIG SpESp TEDQAMED	1685.6	1685.5	1686.6(+1)
6	α_{s1} -CN f(43-58)2P	DIG SpESp TEDQAMEDIK	1926.7	1926.6	1927.7(+1)
7	α_{s1} -CN f(43-59)2P	DIG SpESp TEDQAMEDIKQ	2054.8	2054.7	2055.8(+1)
8	α_{s1} -CN f(44-59)2P	IG SpESp TEDQAMEDIKQ	1940.8	1939.7	1941.8(+1)
9	α_{s1} -CN f(59-71)2P	QMEAESIS SpSp EEI	1598.6	1598.5	1599.6(+1)
10	α_{s1} -CN f(61-74)4P	EAE SpISpSpSp EEIVPN	1808.9	1809.5	1809.9(+1)
11	α_{s1} -CN f(61-79)5P*	EAE SpISpSpSp EEIVPN Sp VEQK	2462.0	2460.8	1232.0(+2)
12	α_{s1} -CN f(62-74)4P	AE SpISpSpSp EEIVPN	1680.8	1680.5	1681.8(+1)
13	α_{s1} -CN f(110-119)1P	EIVPN Sp AEER	1222.6	1222.5	1223.6(+1)
14	α_{s2} -CN f(1-20)4P	KNTMEHV SpSpSp EE SII Sp QETY	2618.0	2617.8	1310.0(+2)
15	α_{s2} -CN f(37-58)3P	STFCKEVVNRNANEE YSIGSpSpSp	2678.2	2677.0	1340.1(+2)
16	α_{s2} -CN f(46-70)4P	NANEE YSIGSpSpSp EE Sp AEVATEEVK	3008.2	3007.0	1505.1(+2)
17	α_{s2} -CN f(53-70)4P	SIG SpSpSp EE Sp AEVATEEVK	2157.7	2157.7	2158.7(+1)
18	α_{s2} -CN f(56-68)3P	SpSp EE Sp AEVATEE	1592.5	1593.4	1593.5(+1)
19	α_{s2} -CN f(117-132)2P	VPITPTLNREQL SpTSp E	1942.7	1943.8	1943.7(+1)
20	α_{s2} -CN f(126-136)2P	EQL SpTSp EE NSK	1410.5	1410.4	1411.5(+1)
21	α_{s2} -CN f(126-137)2P	EQL SpTSp EE NSKK	1538.7	1538.5	1539.7(+1)
22	α_{s2} -CN f(138-147)1P	TVDMES Sp TEVF	1236.5	1236.4	1237.5(+1)
23	α_{s2} -CN f(138-149)1P	TVDMES Sp TEVF TK	1465.6	1465.6	1466.6(+1)
24	α_{s2} -CN f(138-150)1P	TVDMES Sp TEVF TKK	1593.7	1593.7	1594.7(+1)
25	β -CN f(1-25)4P	RELEELNVPGEIVES SpLSpSpSp EE SITR	3122.4	3121.2	1562.2(+2)
26	β -CN f(1-25)3P	RELEELNVPGEIVES SpSpSp EE SITR	3042.4	3041.2	1522.2(+2)
27	β -CN f(2-25)4P	RELEELNVPGEIVES SpLSpSpSp EE SITR	2966.4	2965.1	1484.2(+2)
28	β -CN f(2-18)3P	ELEELNVPGEIVES SpLSpSp	2082.8	2082.8	2083.8(+1)
29	β -CN f(4-25)4P	EELNVPGEIVES SpLSpSpSp EE SITR	2724.2	2723.0	1363.1(+2)
30	β -CN f(7-25)4P	NVPGEIVES SpLSpSpSp EE SITR	2352.0	2351.8	2353.0(+1)
31	β -CN f(8-22)2P	VPGEIVESL SpSp EE S	1707.5	1707.6	1708.5(+1)
32	β -CN f(12-25)4P	IVES SpLSpSpSp EE SITR	1855.7	1855.6	1856.7(+1)
33	β -CN f(17-25)3P	SpSpSp EE SITR	1234.4	1234.3	1235.4(+1)
34	β -CN f(30-44)1P	IEKFQ Sp EEQQQTEDE	1946.9	1946.7	1947.9(+1)
35	β -CN f(30-48)1P	IEKFQ Sp EEQQQTEDELQDK	2432.2	2431.0	1217.1(+2)
36	β -CN f(31-46)1P	EKFQ Sp EEQQQTEDELQ	2074.7	2074.8	2075.7(+1)
37	β -CN f(33-44)1P	FQ Sp EEQQQTEDE	1576.7	1576.5	1577.7(+1)
38	β -CN f(33-45)1P	FQ Sp EEQQQTEDEL	1689.7	1689.6	1690.7(+1)
39	β -CN f(33-46)1P	FQ Sp EEQQQTEDELQ	1817.8	1817.6	1818.8(+1)
40	β -CN f(33-47)1P	FQ Sp EEQQQTEDELQD	1932.8	1932.7	1933.8(+1)
41	β -CN f(33-48)1P	FQ Sp EEQQQTEDELQDK	2060.9	2060.8	2061.9(+1)
42	β -CN f(33-52)1P	FQ Sp EEQQQTEDELQDKIHPF	2556.2	2555.0	1279.1(+2)
43	k-CN f(147-161)1P	ED Sp PEVIESPPEINT	1734.8	1734.7	1735.8(+1)
44	k-CN f(146-161)1P	LED Sp PEVIESPPEINT	1847.9	1847.8	1848.9(+1)

Sp: serina fosforilada; **SpSpSpEE**: secuencia de tres residuos de serina fosforilada seguida de dos residuos de ácido glutámico * indica que este fosfopéptido sólo se ha identificado en el precipitado a pH 8.

Hay que destacar que cinco péptidos mostraron un menor número de residuos fosforilados que el máximo posible, lo que podría deberse a la fosforilación incompleta de la serina o a la desfosforilación de algunas posiciones debida alta temperatura empleada durante el proceso de secado del subproducto. La desfosforilación de la serina en posición 46 (Ser⁴⁶) en el péptido α_{S1} -CN f(38-48)1P, la Ser⁶⁴ y Ser⁶⁶ en el péptido α_{S1} -CN f(59-71)2P y la Ser¹⁵ en el péptido β -CN f(1-25)3P o f(8-22)2P ha sido previamente descrita en hidrolizados trípticos por Ellegard y col., (1999) y Zhu y Fitzgerald, (2010). Otros lugares de fosforilación potencial que no hemos encontrado fosforilados son la Ser⁴⁸ en el péptido α_{S1} -CN f(38-48)1P, la Ser⁵⁶ en el péptido α_{S1} -CN f(56-68)3P y la Ser¹⁷ en el péptido β -CN f(8-22)2P.

Con el fin de evaluar las posibles diferencias en la cantidad de CPPs liberados durante la hidrólisis con tripsina, se llevó a cabo una cuantificación relativa de las secuencias identificadas a los distintos tiempos de hidrólisis estudiados. El pH utilizado durante la precipitación selectiva de los CPPs puede dar lugar a cambios cualitativos o cuantitativos en su obtención. Así, en algunos estudios cuando se han comparado los CPPs obtenidos al precipitar a pH 4,6 y pH 8,0, se han obtenido mayores cantidades de péptidos mono- y difosforilados a pH 8,0 (Adamson y Reynolds, 1995b; Reynolds y col., 1994). La **Figura 8A** muestra la abundancia relativa de cuatro péptidos difosforilados derivados de α_{S1} -CN (con 10 aminoácidos comunes) a los tres pH de precipitación usados. De acuerdo con los estudios mencionados anteriormente, los hidrolizados precipitados a pH 8,0 mostraron mayor cantidad de CPPs que los precipitados a pH 4,0 y 6,0. Por el contrario, los CPPs con más de dos residuos fosforilados mostraron un comportamiento diferente. La **Figura 8B** muestra la recuperación relativa del péptido α_{S2} -caseína f(56-68)3P, que presentó, a los tiempos estudiados, una mayor cantidad en el precipitado a pH 6,0. Cuando se consideró el efecto del tiempo de hidrólisis, se observó que este péptido se formaba después de 30 min

y su cantidad relativa disminuía después de 120 min de hidrólisis con tripsina. Esto refleja su susceptibilidad a la degradación por acción de la tripsina cuando el tiempo de hidrólisis es largo.

Para estudiar la influencia del tiempo de hidrólisis en la cantidad obtenida de CPPs con la secuencia característica SpSpSpEE, se determinaron las cantidades relativas del péptido β -CN f(1-25)4P y cuatro péptidos relacionados que comparten el mismo extremo C-terminal precipitados a pH 8,0 a los distintos tiempos estudiados (**Figura 8C**). Se observó un claro descenso del péptido β -CN f(1-25)4P junto a un aumento de los CPPs β -CN f(7-25)4P y f(12-25)4P con el tiempo de hidrólisis, pero no se observaron cambios relevantes en la formación de los CPPs β -CN f(2-25)4P y β -CN f(17-25)3P. Se ha descrito la importancia de la conformación estructural de estos péptidos para ejercer su actividad biológica, debido no sólo a la presencia de la secuencia aminoacídica típica SpSpSpEE, sino que también la secuencia precedente en el extremo N-terminal puede jugar un papel importante (Ferraretto y col., 2003). Así, de los CPPs cuya cantidad aumentaba al precipitar a pH 8,0, el péptido β -CN f(7-25)4P mostró en la región N-terminal una secuencia favorable para el desarrollo de la actividad biológica, siendo este péptido uno de los que más aumenta con el tiempo de hidrólisis. Es posible que a pesar de la disminución del CPP β -CN f(1-25)4P con el tiempo de hidrólisis, el aumento del péptido β -CN f(7-25)4P permita mantener la actividad biológica de la mezcla de CPPs a los 120 min de hidrólisis. El descenso en la cantidad del CPP β -CN f(1-25)4P coincide con los resultados obtenidos por Su y col., (2007) que identificaron el mismo fosfopéptido desde los 10 min hasta 1 h de hidrólisis de caseína con pancreatina, pero no a las 2 h. Sin embargo, estos autores no identificaron los péptidos anteriormente mencionados.

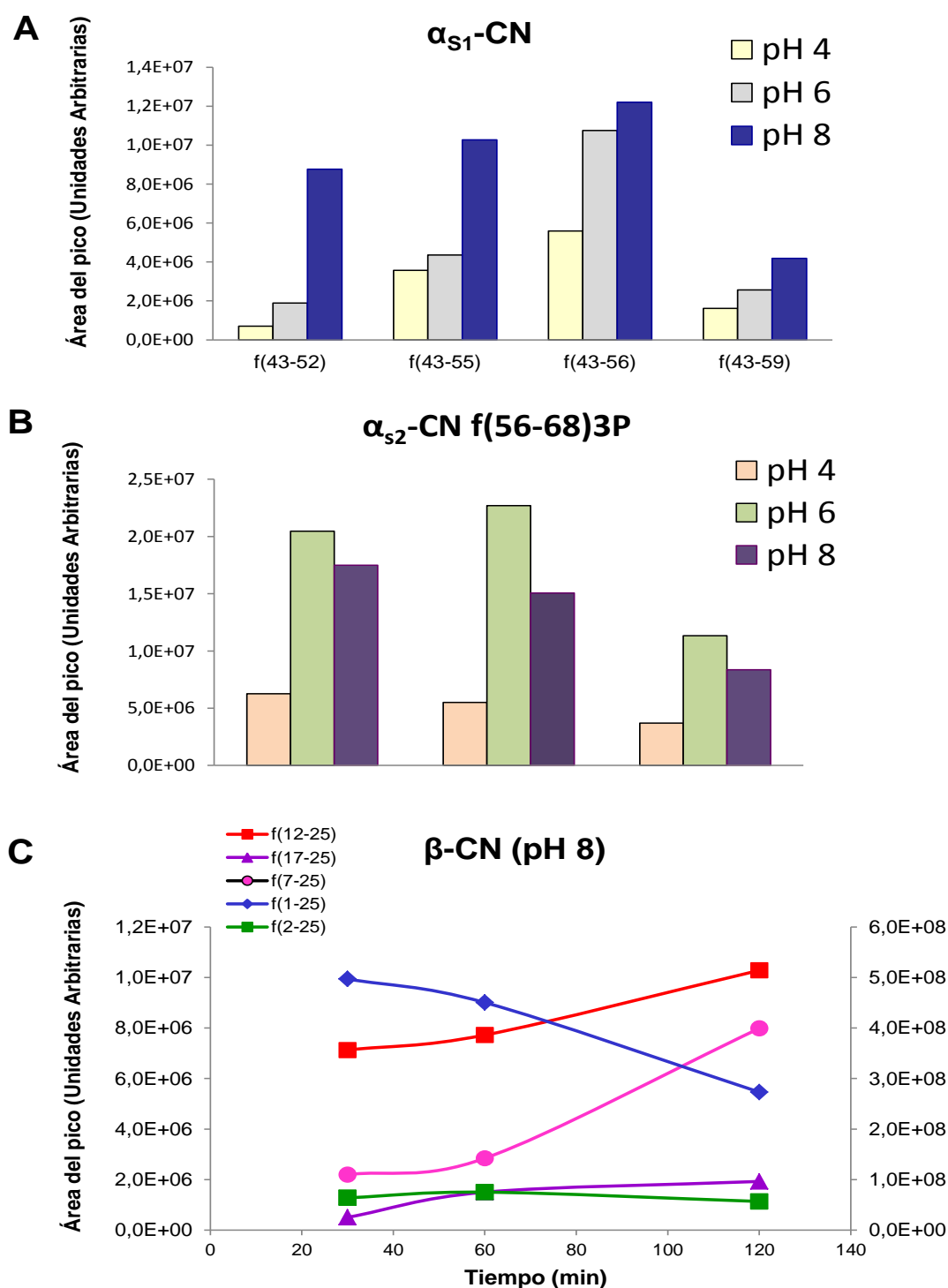


Figura 8. (A) Cantidad relativa de α_{s1} -CN f(43-52), f(43-55), f(43-56) y f(43-59) después de 120 min de hidrólisis trípica con precipitación selectiva a pH 4,0, 6,0 y 8,0. (B) Cantidad relativa de α_{s2} -CN f(56-68)3P después de la hidrólisis con tripsina a 30, 60, y 120 min con precipitación selectiva a pH 4,0, 6,0 y 8,0. (C) Cantidad relativa de β -CN f(1-25)4P, f(7-25)4P, f(12-25)4P, f(17-25)3P y f(2-25)4P después de 30, 60 y 120 min de hidrólisis trípica con precipitación selectiva a pH 8,0.

1.1.3. CPPs formados tras la simulación de la digestión gastrointestinal

Mediante el análisis de RP-HPLC-MS/MS, se identificaron un total de 37 CPPs, de los cuales 13 procedían de la α_{s1} -CN, 8 de la α_{s2} -CN, 16 de la β -CN, y dos de la κ -CN después de simular la digestión gastrointestinal del subproducto de caseína. La **Figura 9** muestra la comparación de las secuencias peptídicas procedentes de la hidrólisis del subproducto con tripsina y tras la simulación de la digestión gastrointestinal. Se observó que la simulación de la digestión gastrointestinal origina péptidos fosforilados similares a los producidos por la hidrólisis con tripsina, existiendo un 90% de coincidencia entre las secuencias obtenidas después de ambos procesos de hidrólisis. Sólo se encontraron pequeñas diferencias entre las secuencias y, de hecho, los CPPs identificados en el hidrolizado de tripsina y los obtenidos por la simulación de la digestión gastrointestinal presentaron una homología del 73%. Algunos CPPs previamente descritos, como, β -CN f(1-25)4P, α_{s1} -CN f(43-58)2P y α_{s2} -CN f(56-68)3P y algunos fragmentos derivados de ellos se encontraron tanto en el hidrolizado de tripsina como en el obtenido tras la simulación de la digestión gastrointestinal.

Estudios previos han encontrado un perfil peptídico similar entre hidrolizados trópicos de caseína y/o β -CN (*in vitro*) y el contenido intestinal de ratas alimentadas con una dieta a base de caseína y/o β -CN (*in vivo*) (Naito y Suzuki, 1974; Sato y col., 1991), aunque los residuos de Lys y Arg de los extremos carboxi- y amino-terminal, respectivamente, no se encontraron en los digeridos *in vivo* de caseína y β -CN, en comparación con las condiciones *in vitro*. Además, el péptido α_{s1} -CN f(66-74)3P se ha identificado en el contenido duodenal de cerdos alimentados con una dieta basada en caseína (Meisel y Frister, 1989), que tiene el mismo lugar de corte que α_{s1} -CN f(61-74)4P y α_{s1} -CN f(62-74)4P, y comprende al péptido α_{s1} -CN f(59-71)2P que ha sido identificado en nuestro

estudio (**Figura 9**). Estos lugares de corte coinciden con los de los péptidos α_{s1} -CN f(62-69)4P y α_{s1} -CN f(64-73)4P identificados en heces de ratas alimentadas con caseína (Kasai y col., (1992). El péptido de β -CN f(33-44)4P identificado en nuestro trabajo también se encontró en el estómago de humanos 20 min después de haber ingerido leche (Chabance y col., 1998). Más recientemente, Boutrou y col. (2013) han identificado mediante espectrometría de masas los péptidos β -CN f(33-48)1P y α_{s1} -CN f(110-119)1P en efluentes de yeyuno de humanos tras el consumo de caseína. Estas dos secuencias también se encuentran en los digeridos e hidrolizados del subproducto estudiado. Asimismo, estos mismos autores describen el fragmento α_{s2} -CN f(138-146)1P que comprende a los péptidos α_{s2} -CN f(138-147)1P y α_{s2} -CN f(138-149)1P identificados en este estudio. Estos resultados indican que la simulación de la digestión gastrointestinal del suproducto industrial estudiado da lugar a algunos CPPs similares a los formados *in vivo*. Igualmente, nuestros resultados corroboran los obtenidos por otros autores (García-Nebot y col., 2010) respecto a la resistencia de las regiones fosforiladas a la digestión gastrointestinal. Estos autores han descrito la resistencia de los CPPs cuando se añaden a bebidas de fruta y se someten a una simulación de la digestión gastrointestinal. La mayor parte de los CPPs que se añadieron a las bebidas de fruta pudieron observarse después de la simulación de la digestión gastrointestinal, aunque habían perdido uno o dos aminoácidos en el extremo C- ó N-terminal.

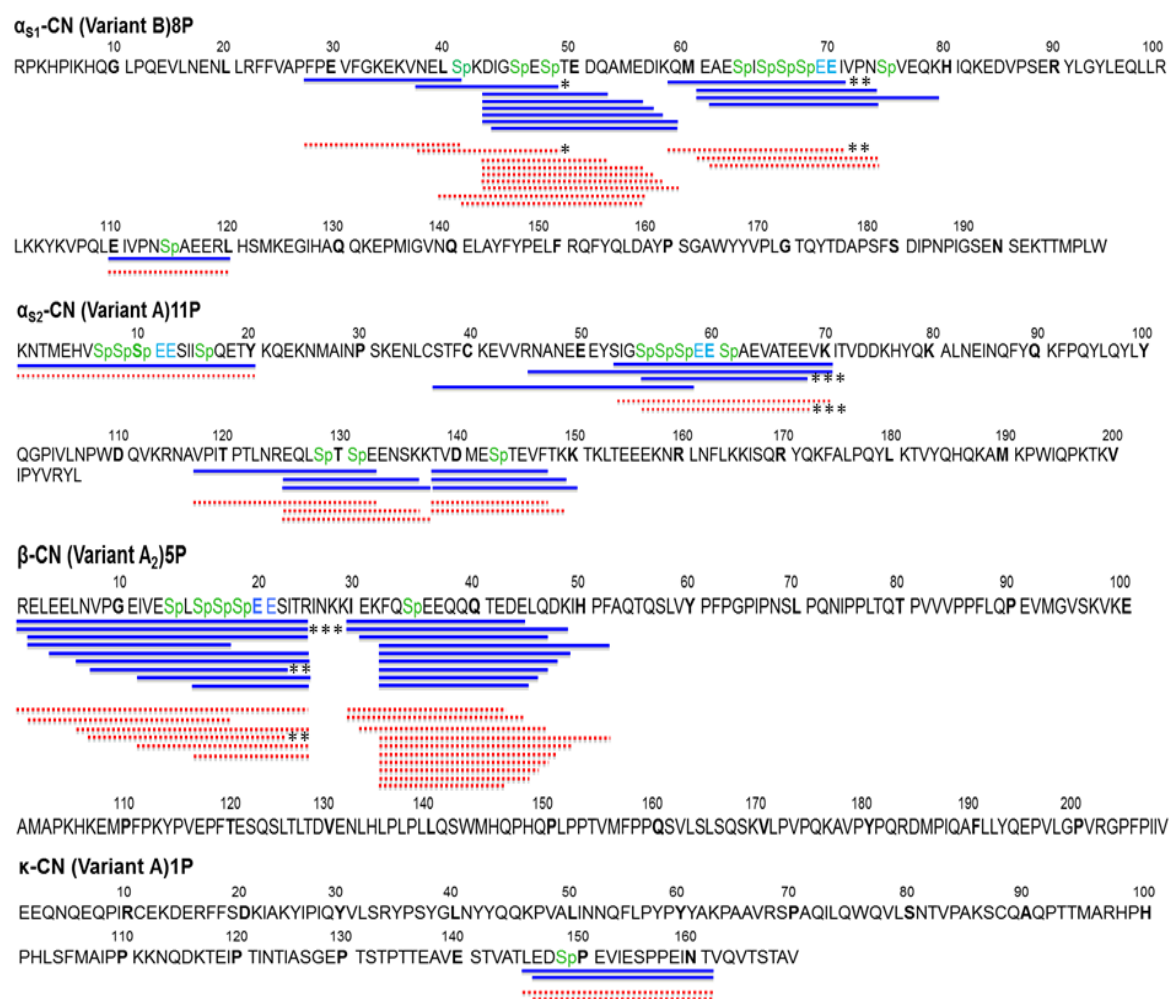


Figura 9. Secuencias de caseinofosfopéptidos identificados a partir del subproducto derivado de caseína sometido a hidrólisis con tripsina (línea continua) y después de la simulación de la digestión gastrointestinal (línea de puntos) **Sp**: serina fosforilada; **SpSpSpEE**: secuencia de tres residuos de serina fosforilada seguida de dos residuos de ácido glutámico; *indica residuo de serina sin fosforilar.

Picariello y col., (2010) han estudiado la formación de péptidos después de la simulación de la digestión con pepsina y una mezcla de tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y elastasa seguida de incubación con extractos de membranas de microvellosidades intestinales humanas. En ese caso, el enriquecimiento de las regiones fosforiladas se llevó a cabo con micro-columnas de TiO_2 . En dicho estudio, identificaron 6 péptidos pertenecientes a la región α_{s1} -CN f(104-119), frente a una única secuencia, α_{s1} -CN

f(110-119), identificada en nuestro estudio. Asimismo, en los resultados publicados por Picariello y col., (2010) no se identificaron péptidos que correspondieran a la región α_{s1} -CN f(43-59) mientras que en el presente estudio se identifican numerosos péptidos en esta zona. Respecto a los péptidos procedentes de la β -CN, en ambos estudios, se han identificado numerosos péptidos pertenecientes a la región β -CN f(30-52) pero, por el contrario, mientras que en el presente trabajo se identifican distintos péptidos de la región N-terminal de la β -CN, en el publicado anteriormente sólo se identifican dos secuencias de la región β -CN f(1-25). Nuestros resultados son similares a los anteriormente descritos por Su y col., (2007) donde identifican varios péptidos de la región N-terminal de la β -CN en un digerido de caseína con pancreatina. A este respecto, se ha descrito que, además de la presencia de los residuos fosforilados, la unión de los CPPs a cationes divalentes los protege de la hidrólisis, como se observó en un estudio sobre la acción de las enzimas de las microvellosidades intestinales sobre el péptido β -CN f(1-25) (Boutrou y col., 2010). Por tanto, algunas de las diferencias encontradas entre los estudios que utilizan hidrólisis *in vitro* pueden atribuirse a las diferencias en el contenido mineral del sustrato y a las distintas condiciones aplicadas en la hidrólisis o en la digestión gastrointestinal, así como a la técnica empleada para el enriquecimiento y para el análisis de los mismos.

En estudios animales, Bouhallab y col., (1999) evaluaron la sensibilidad de β -CN f(1-25)4P en duodeno de rata e identificaron los péptidos β -CN f(2-25)4P y β -CN f(7-25)4P. Ambos sitios de corte ($^1\text{Arg-Glu}^2$ y $^6\text{Asn-Val}^7$) han sido encontrados también en nuestro estudio. Del mismo modo, α_{s1} -CN f(59-71)2P, α_{s1} -CN f(61-74)4P y α_{s1} -CN f(62-74)4P identificados a partir del subproducto de caseína tras simular la digestión gastrointestinal pertenecen a la región α_{s1} -CN f(59-79)5P, que se encontró en el íleon de ratas después de la administración por sonda gástrica de una mezcla de CPPs (Brommage y col., 1991). En un extracto de íleon de rata después de la ingestión de una preparación de CPPs, se

identificaron los péptidos α_{s1} -CN f(61-74)4P y β -CN f(7-24)4P (Hirayama y col., 1992). La primera secuencia está presente en nuestro digerido mientras que la segunda está comprendida en el péptido β -CN f(7-25)4P. Por tanto, de este estudio comparativo entre los resultados encontrados y los antecedentes bibliográficos, se puede concluir que durante la simulación de la digestión gastrointestinal del subproducto industrial de caseína se generan CPPs idénticos u homólogos a péptidos previamente descritos tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo*. Las secuencias encontradas contienen en muchos casos la estructura característica de los CPPs más estudiados y con mayor afinidad a minerales y presentan numerosas fosforilaciones, poniendo de manifiesto, que el tratamiento tecnológico aplicado en la industria es compatible con la producción de CPPs al no inducir la desfosforilación de los mismos. Las regiones de caseína donde se han identificado un mayor número de CPPs, tanto en los hidrolizados trópicos como en las simulaciones de la digestión gastrointestinal, corresponden a α_{s1} -CN f(43-59), β -CN f(1-25) y β -CN f(30-43). Estas regiones se caracterizan por tener una alta hidrofobicidad a pH 3,0 (condiciones gástricas), que junto con la presencia de fosforilaciones, juega un papel clave en la resistencia de estas regiones de las caseínas a la digestión (Dupont y col., 2010a y b). Estos hechos sugieren que cuando el subproducto derivado de caseína sea ingerido estos péptidos serán capaces de resistir la digestión.

Por tanto, los resultados de este estudio indican que la fracción de caseína parcialmente hidrolizada obtenida como subproducto durante la producción de un hidrolizado antihipertensivo puede utilizarse como fuente de CPPs. La identificación y la semicuantificación de CPPs permitieron evidenciar la similitud de los CPPs formados durante la hidrólisis con diferente pH de precipitación y diferente tiempo de hidrólisis, aunque en algunas secuencias se encontró diferencia en la cantidad obtenida. Estos resultados son importantes para poder seleccionar las mejores condiciones y aumentar la

producción de péptidos que contengan la secuencia característica SpSpSpEE. La identificación de CPPs en el subproducto de caseína después de ser sometido a la simulación de la digestión gastrointestinal ha demostrado que este proceso genera secuencias de CPPs muy similares a los producidos por la hidrólisis con tripsina. Por tanto, se considera que el subproducto industrial estudiado podría ser empleado como fuente de CPPs sin necesidad de ser sometido a otros procesos de hidrólisis. A partir de estos resultados se abre una vía de utilización del subproducto como ingrediente funcional para mejorar la biodisponibilidad mineral. Estos resultados han servido como base para el desarrollo de productos enriquecidos en Fe y Ca. Dichos resultados no se muestran en la presente memoria por motivos de confidencialidad.

1.2. Identificación de péptidos con afinidad al hierro derivados de proteínas de suero

En la misma línea de reutilización de subproductos de naturaleza proteica indicada anteriormente y puesto que el suero de quesería representa el mayor subproducto del proceso de elaboración del queso (Smithers, 2008), se planteó la identificación de péptidos derivados de proteínas de suero con capacidad para unir minerales, concretamente hierro. Además, aunque se conocía que las proteínas de suero tienen una considerable capacidad para unir cationes divalentes y trivalentes como Fe^{+2} y Fe^{+3} (Chaud y col., 2002), no se habían identificado las secuencias peptídicas responsables de esta unión, por lo que era muy interesante profundizar en este aspecto. Además, de esta forma, se podría avanzar en el conocimiento sobre la relación estructura-actividad de péptidos con esta actividad.

Con este objetivo, a partir de las fracción menor de 5 kDa obtenida a partir de hidrolizados de un aislado de proteínas de suero con Alcalasa[®], pancreatina y Flavourzyme[®] se aislaron mediante IMAC-Fe (III) diferentes péptidos con afinidad a hierro. Estas fracciones, previamente, habían mostrado una mejora significativa de la

dializabilidad del hierro (De la Hoz y col., 2014a). Aunque el ensayo de la dializabilidad del hierro no es una medida de absorción, es indicativo de que el hierro se encuentra biodisponible. De hecho, este ensayo es comúnmente empleado para predecir la biodisponibilidad del hierro en alimentos e ingredientes y para estudiar los factores que afectan dicha biodisponibilidad (Fairweather-Tait y col., 2005; Argyri y col., 2011).

1.2.1. Identificación de péptidos de suero lácteo en los hidrolizados y en las fracciones con afinidad al hierro mediante RP-HPLC-MS/MS

La **Figura 10** muestra los péptidos de los distintos hidrolizados formados a partir de β -Lg, la principal proteína del suero lácteo bovino, identificados en la fracción retenida mediante IMAC-Fe(III). Independientemente de la enzima empleada, los péptidos con capacidad de unión a hierro pueden agruparse principalmente en dos regiones de la β -Lg, f(42-59) y f(122-137). Cuando se utilizó pancreatina como enzima, no se encontraron péptidos en regiones distintas a las indicadas, $^{42}\text{YVEELKPTPEGDLEILLQ}^{59}$ y $^{125}\text{TPEVDDEALEKFD}^{137}$. Es importante destacar que ambos dominios son especialmente ricos en aminoácidos cargados negativamente, como Glu y Asp. De hecho, en la región β -Lg f(42-59), 5 de los 18 aminoácidos son Glu o Asp, así como en la región β -Lg f(122-137) donde 6 de los 16 residuos están cargados negativamente. Como ejemplo, la **Figura 11** muestra el patrón de fragmentación del péptido $^{125}\text{TPEVDDE}^{131}$. En este péptido, cuatro de los siete aminoácidos están cargados negativamente y tiene un residuo de Pro.

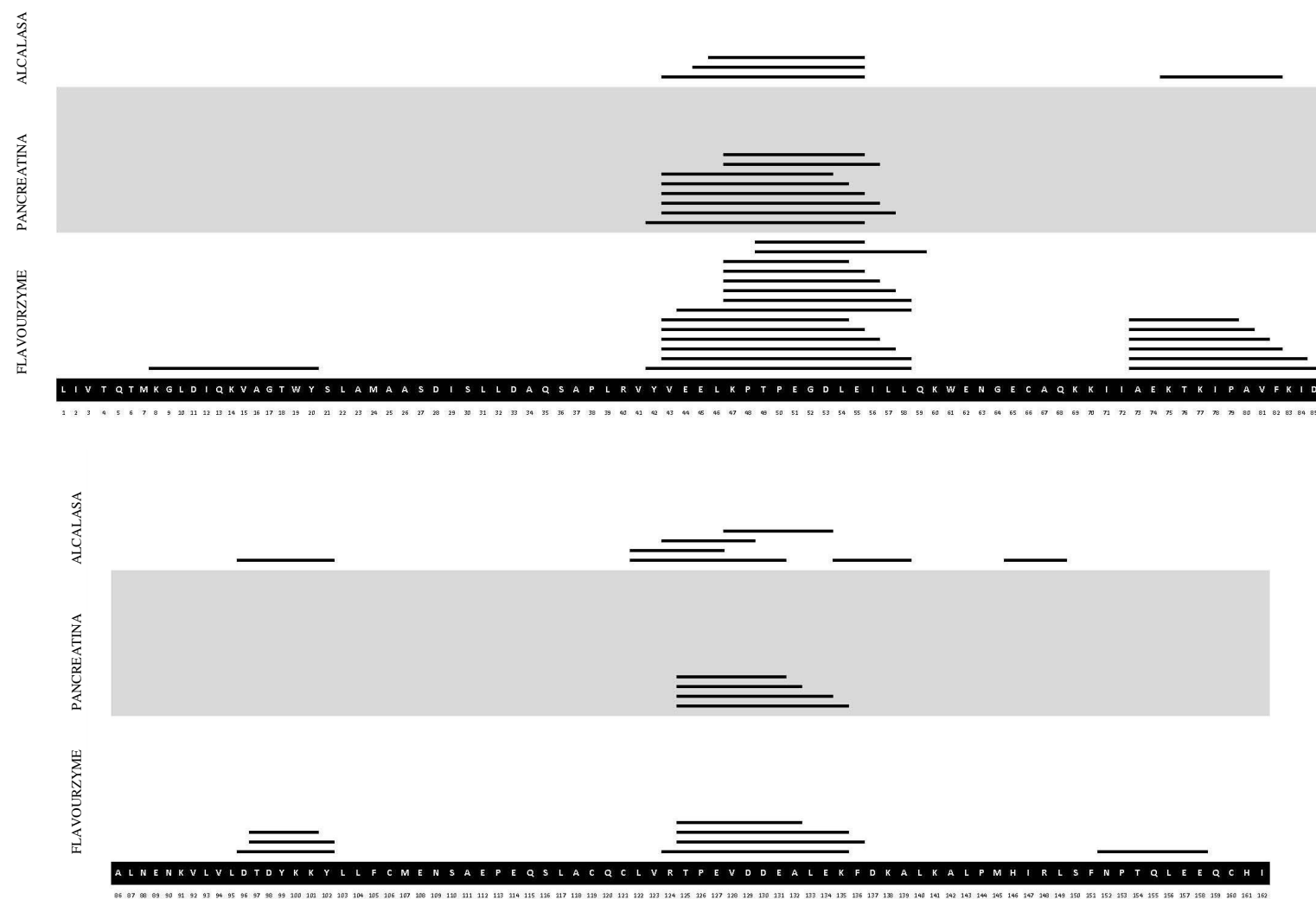


Figura 10. Representación esquemática de los péptidos identificados de β -Lg bovina en la fracción obtenida mediante IMAC-Fe (III) tras diferentes tratamientos enzimáticos con las enzimas Alcalasa[®], pancreatina, y Flavourzyme[®].

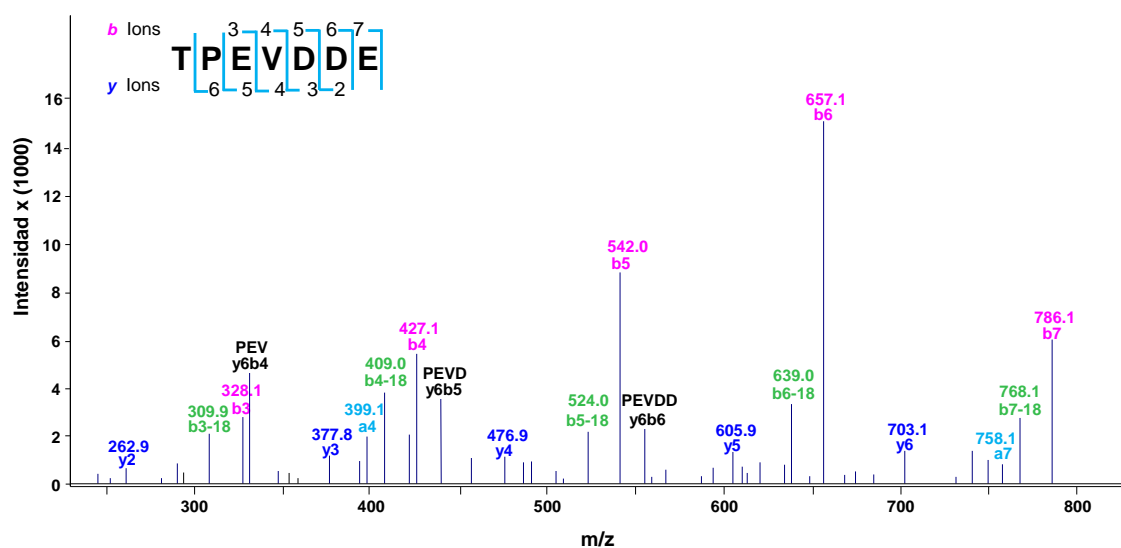


Figura 11. Espectro de masas en tándem del ión con carga (+1) y m/z 804.3. El péptido fue identificado como β -lactoglobulina f(125-131). La secuencia del péptido y los iones generados tras su fragmentación se muestran en el espectro.

La **Figura 12** muestra los péptidos identificados en la fracción obtenida mediante IMAC-Fe (III) a partir de los hidrolizados de α -La con Alcalasa[®], pancreatina, y Flavourzyme[®]. Hay que señalar que las enzimas Flavourzyme[®] y pancreatina dieron lugar a un mayor número de péptidos cargados negativamente en la región α -La f(81-88) donde cinco de los ocho residuos correspondieron a Asp. Los tratamientos enzimáticos con Alcalasa[®] y pancreatina dieron lugar a un mayor número de péptidos de α -La en la fracción IMAC-Fe (III) que los obtenidos por hidrólisis con Flavourzyme[®].

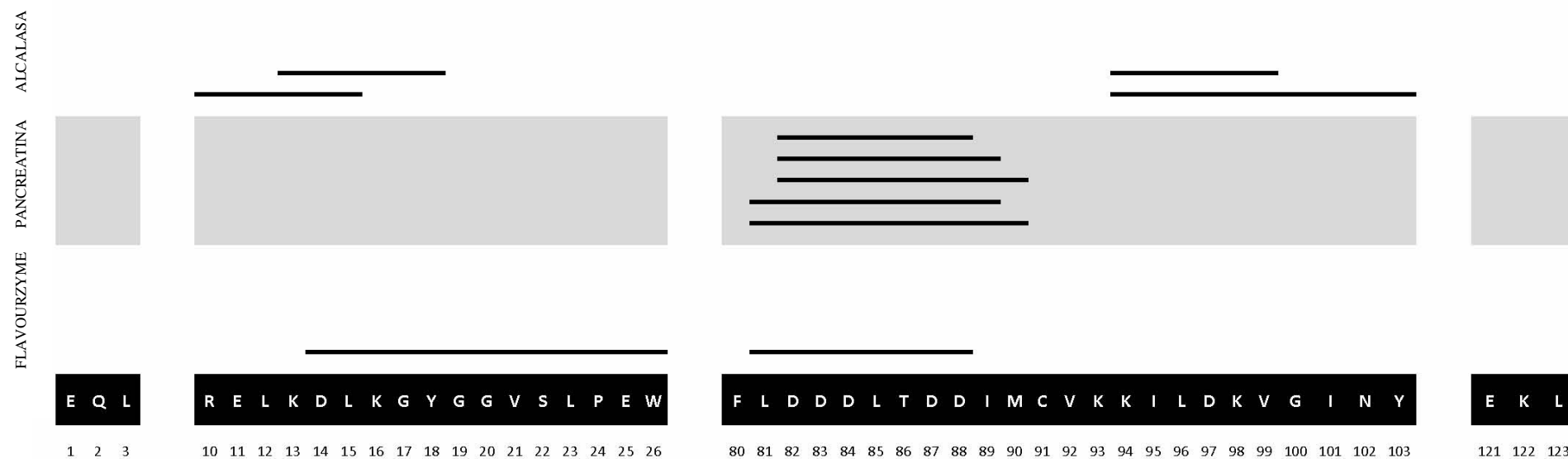


Figura 12. Representación esquemática de los péptidos identificados de α -Lactoalbúmina bovina en la fracción IMAC-Fe (III) tras diferentes tratamientos enzimáticos con las enzimas Alcalasa[®], pancreatina, y Flavourzyme[®].

Además, la caracterización detallada de la fracción menor de 5 kDa obtenida a partir de los hidrolizados y la fracción obtenida mediante IMAC-Fe (III) se presentan en la **Tabla 9**. Se puede observar que una alta proporción de los péptidos identificados en la fracción menor de 5 kDa del hidrolizado con Flavourzyme[®], también se une a la columna de IMAC-Fe (III). Por el contrario, la relación se redujo considerablemente en los hidrolizados con las otras dos enzimas, especialmente con Alcalasa[®]. Se sabe que la estructura de β -Lg es muy estable, en una conformación globular compacta estabilizada por dos enlaces disulfuro intramoleculares, lo que limita la acción de ciertas enzimas en condiciones fisicoquímicas comunes (Otte y col., 1997). Esta característica podría explicar el hecho de que existan amplias regiones de la proteína con una asignación de péptidos escasa o nula. En este estudio, el análisis de los péptidos se realizó sin reducción previa de los puentes disulfuro. Considerando los resultados previos de Martínez-Maqueda y col., (2013) en los que varios heterodímeros de β -Lg se unen a través de puentes disulfuro y la geometría de estos péptidos, no parece probable que estas formas estén presentes en la fracción menor de 5 kDa que se sometió a IMAC-Fe (III). Por otra parte, la actividad endoproteínasa y la amplia especificidad de la Alcalasa[®] y la actividad endoproteínasa y exopeptidasa de la Flavourzyme[®] podrían explicar la presencia de péptidos de diferentes regiones de β -Lg (O'Keeffe y FitzGerald, 2014). De hecho, se observa como la hidrólisis con Flavourzyme[®] dio lugar a la formación de péptidos muy variados con afinidad al hierro.

Tabla 9. Péptidos identificados de β -Lactoglobulina bovina bajo diferentes tratamientos enzimáticos (Alcalasa[®], pancreatina y Flavourzyme[®]). La identificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa y espectrometría de masas en tándem. Se indican los péptidos identificados en la fracción menor de 5 kDa de los hidrolizados de proteínas de suero lácteo (WPH), y fracción retenida mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos Fe (III) (IMAC).

FRAGMENTO β -LACTOGLOBULINA	SECUENCIA DE AMINOACIDOS	MASA TEÓRICA	ALCALASA		PANCREATINA		FLAVOURZYME	
			WPH	IMAC	WPH	IMAC	WPH	IMAC
01 - 05	LIVTQ	572,35	•					
02 - 05	IVTQ	459,27	•					
06 - 10	TMKGL	548,30	•					
08 - 13	KGLDIQ	672,38			•			
08 - 20	KGLDIQKVAGTWY	1477,79					•	•
26 - 32	ASDISLL	717,39	•					
27 - 32	SDISLL	646,35	•					
42 - 58	YVEELKPTPEGDLEILL	1957,03					•	•
42 - 57	YVEELKPTPEGDLEIL	1843,95			•			
42 - 56	YVEELKPTPEGDLEI	1730,86			•			
42 - 55	YVEELKPTPEGDLE	1617,78			•	•		
42 - 47	YVEELK	777,40					•	
43 - 58	VEELKPTPEGDLEILL	1793,97					•	•
43 - 57	VEELKPTPEGDLEIL	1680,88			•	•	•	•
43 - 56	VEELKPTPEGDLEI	1567,80			•	•	•	•
43 - 55	VEELKPTPEGDLE	1454,71	•	•	•	•	•	•
43 - 54	VEELKPTPEGDLE	1325,67			•	•	•	•
43 - 53	VEELKPTPEGD	1212,59			•	•		
43 - 51	VEELKPTPE	1040,54			•			
43 - 49	VEELKPT	814,44			•			
44 - 58	EELKPTPEGDLEILL	1694,90					•	•
45 - 55	ELKPTPEGDLE	1226,60	•	•				
46 - 57	LKPTPEGDLEIL	1323,73	•					
46 - 55	LKPTPEGDLE	1097,56	•	•			•	
46 - 51	LKPTPE	683,39	•					
47 - 58	KPTPEGDLEILL	1323,73					•	•
47 - 57	KPTPEGDLEIL	1210,64					•	•
47 - 56	KPTPEGDLEI	1097,56			•	•	•	•
47 - 55	KPTPEGDLE	984,48			•	•	•	•
47 - 54	KPTPEGDLE	855,43					•	•
49 - 59	TPEGDLEILLQ	1226,64					•	•
49 - 58	TPEGDLEILL	1098,58					•	
49 - 55	TPEGDLE	759,33					•	•
50 - 57	PEGDLEIL	884,45			•			

(Continuación Tabla 9)

FRAGMENTO β-LACTOGLOBULINA	SECUENCIA DE AMINOACIDOS	MASA TEÓRICA	ALCALASA		PANCREATINA		FLAVOURZYME	
			WPH	IMAC	WPH	IMAC	WPH	IMAC
50 - 56	PEGDLEI	771,36			•			
52 - 56	GDLEI	545,27			•			
71 - 74	IIAE	444,26	•					
73 - 86	AEKTKIPAVFKIDA	1529,88					•	
73 - 85	AEKTKIPAVFKID	1458,84					•	•
73 - 84	AEKTKIPAVFKI	1343,82					•	•
73 - 82	AEKTKIPAVF	1102,64					•	•
73 - 81	AEKTKIPAV	955,57					•	•
73 - 80	AEKTKIPA	856,50					•	•
73 - 79	AEKTKIP	785,46					•	•
74 - 82	EKTKIPAVF	1031,60	•					
74 - 80	EKTKIPA	785,46					•	
75 - 82	KTKIPAVF	902,56	•	•				
76 - 82	TKIPAVF	774,46	•					
76 - 80	TKIPA	528,33			•			
77 - 82	KIPAVF	673,42	•					
83 - 87	KIDAL	558,34	•					
88 - 93	NENKVL	715,39	•					
96 - 102	DTDYKKY	931,43	•	•			•	•
96 - 100	DTDYK	640,27	•					
97 - 102	TDYKKY	816,40					•	•
97 - 101	TDYKK	653,34					•	•
110 - 116	SAEPEQS	746,31			•			
111 - 116	AEPEQS	659,27					•	
122 - 131	LVRTPEVDDE	1171,57	•	•				
122 - 127	LVRTPE	713,41	•	•				
123 - 134	VRTPEVDDEALE	1371,65	•					
123 - 131	VRTPEVDDE	1058,49	•					
123 - 127	VRTPE	600,32	•					
124 - 135	RTPEVDDEALEK	1400,68					•	•
124 - 129	RTPEVD	715,35	•	•				
125 - 137	TPEVDDEALEKFD	1506,67			•			
125 - 136	TPEVDDEALEKF	1391,65					•	•
125 - 135	TPEVDDEALEK	1244,58			•	•	•	•
125 - 134	TPEVDDEALE	1116,48			•	•		
125 - 132	TPEVDDEA	874,36			•	•	•	•
125 - 131	TPEVDDE	803,32			•	•		
128 - 134	VDDEALE	789,34	•	•				
135 - 139	KFDKA	607,33	•	•				
137 - 144	DKALKALP	854,52					•	
137 - 141	DKALK	573,35	•					
137 - 140	DKAL	445,25	•					

(Continuación Tabla 9)

FRAGMENTO β -LACTOGLOBULINA	SECUENCIA DE AMINOACIDOS	MASA TEÓRICA	ALCALASA		PANCREATINA		FLAVOURZYME	
			WPH	IMAC	WPH	IMAC	WPH	IMAC
142 - 145	ALPM	430,22	•					
146 - 150	HIRLS	624,37	•					
146 - 149	HIRL	537,34	•	•				
149 - 154	LSFNPT	677,34	•		•			
152 - 158	NPTQLEE	829,38					•	•
155 - 159	QLEEQ	645,29	•		•			

1.2.2. Perfil aminoacídico de los hidrolizados y de las fracciones con afinidad al hierro

La determinación del perfil de aminoácidos se realizó con el fin de proporcionar información acerca de los aminoácidos más abundantes en las fracciones enriquecidas en péptidos con afinidad al hierro. De esta forma, se completa la caracterización al identificar no solo los aminoácidos libres presentes, sino aminoácidos correspondientes a péptidos de pequeño tamaño (di-, tri-péptidos) que no han podido ser identificados mediante el análisis por espectrometría de masas por limitaciones de la técnica. La **Figura 13** muestra, para cada tratamiento enzimático, el contenido relativo de los diferentes aminoácidos en la fracción menor de 5 kD) e IMAC-Fe (III), de tal modo que se pueden observar variaciones en ciertos aminoácidos como consecuencia de la aplicación de la cromatografía IMAC-Fe (III).

Independientemente de la enzima utilizada para preparar el hidrolizado, los aminoácidos Asp y Glu aumentaron su presencia en las fracciones cromatográficas, especialmente en las obtenidas con pancreatina y Flavourzyme[®]. Estos aminoácidos, Asp y Glu, presentaron los mayores incrementos en las fracciones IMAC-Fe (III) en comparación con la correspondiente fracción menor de 5 kDa, con diferencias porcentuales de hasta 8,9 y 11,2 unidades, respectivamente, en el caso del hidrolizado con pancreatina. Por otro lado, el contenido de Pro mostró un incremento de 4,5 unidades porcentuales en la fracción

cromatográfica respecto a la fracción menor de 5 kDa del hidrolizado obtenido con Flavourzyme[®]. De hecho, el aminoácido Pro con un porcentaje de 10,9 constituyó el tercer aminoácido más abundante en la fracción IMAC-Fe(III) obtenida a partir del hidrolizado con Flavourzyme[®], siendo estos resultados coherentes con los obtenidos por espectrometría de masas. Por el contrario, otros aminoácidos mostraron una disminución en la fracción unida a hierro. Leu es el aminoácido cuyo contenido se redujo notablemente en las fracciones IMAC-Fe (III), con disminuciones de 4,3; 7,6, y 7,5% respecto a las correspondiente fracción menor de 5 kDa de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa[®], pancreatina y Flavourzyme[®], respectivamente.

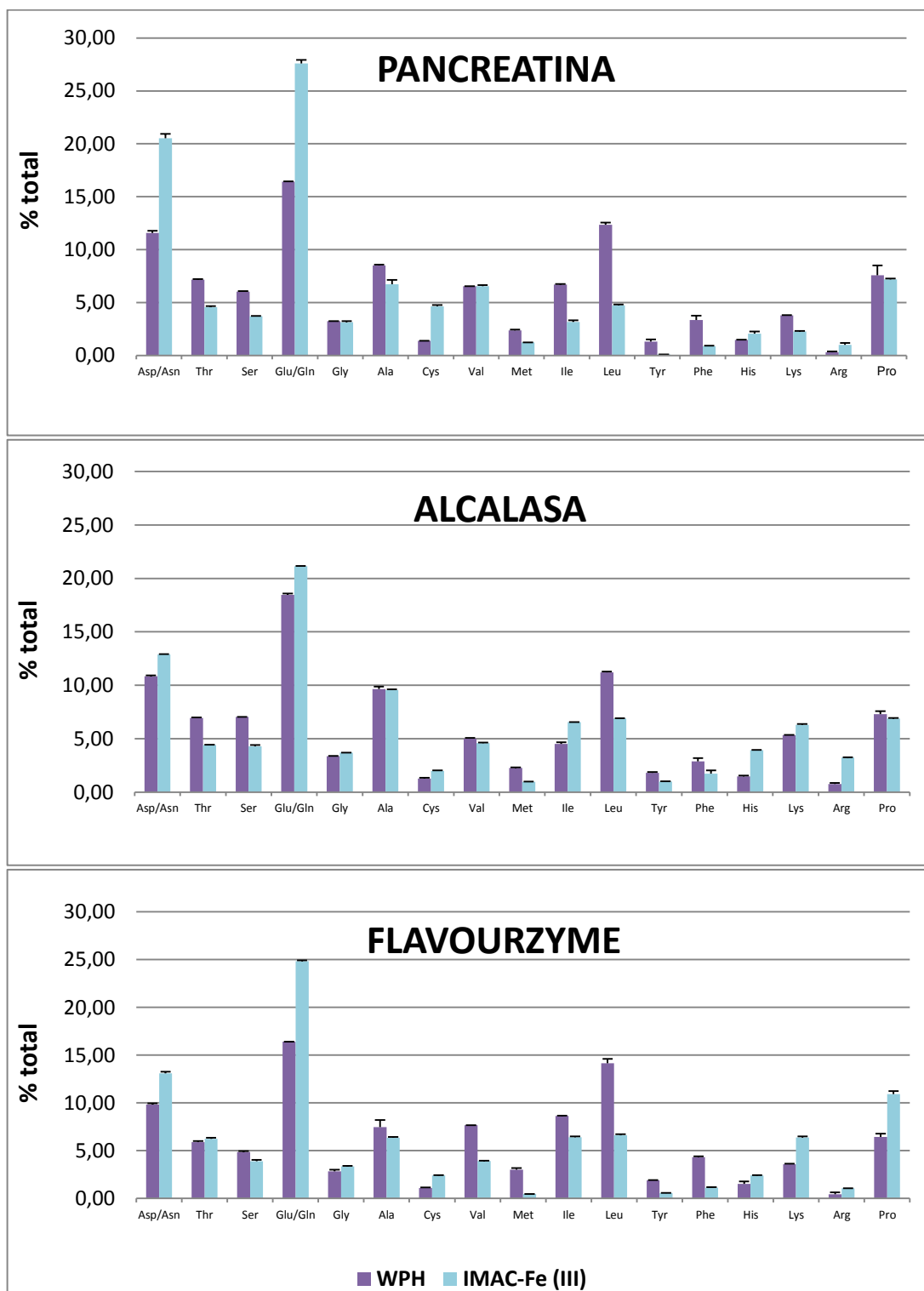


Figura 13. Aminoácidos totales determinados en la fracción menor de 5 kDa y en la fracción obtenida mediante IMAC-Fe (III). Datos expresados como porcentaje de cada aminoácido respecto al contenido total, la barra de error corresponde a la desviación estándar (n=2). Asn y Gln detectados como Asp y Glu, respectivamente, debido a su desaminación durante la etapa de preparación. Trp resulta completamente degradado durante el análisis.

Estos resultados están de acuerdo con los recogidos en la bibliografía sobre la composición aminoacídica de péptidos de distintos orígenes con capacidad quelante de hierro. Así, por ejemplo, se conoce el papel de los aminoácidos Asp, Glu y Pro para la unión al hierro. La presencia de péptidos con estos aminoácidos se ha relacionado con la mejora de la absorción de hierro en células Caco-2 (Ou y col., 2010) y el efecto positivo en la biodisponibilidad del hierro no hemo de la carne (Storcksdieck, y col., 2007). Se ha descrito que Asp y Glu pueden unir hierro de forma muy estable con una probable estructura tridentada (Perrin, 1958), y que el aminoácido Pro forma complejos estables con hierro debido a su naturaleza cíclica (Nelson y Cox, 2004). Por otra parte, con base a que los péptidos ricos en Pro muestran una mayor resistencia a las enzimas digestivas, se ha propuesto una mayor estabilidad en el tracto digestivo para los complejos de hierro con Pro (Yaron y col., 1993).

Estos resultados, indican que independientemente de la enzima utilizada en la hidrólisis del aislado de proteínas de suero lácteo, los dominios f(42-59) y f(125-137) de β -Lg englobaron la mayoría de los péptidos identificados. Además, todos ellos mostraron ciertas características comunes, tales como la abundancia de ciertos aminoácidos como Asp, Glu y Pro. Sin embargo, cada tratamiento enzimático presentó propiedades particulares como la proporción específica de ciertos aminoácidos y diferente cobertura de proteína de las principales proteínas de suero. La caracterización de las fracciones unidas a IMAC-Fe (III) realizada en este estudio permite conocer mejor la relación que existe entre la estructura de los péptidos y su afinidad por el hierro, y respalda el papel de los hidrolizados de proteína de suero de leche como posibles ingredientes para el diseño de suplementos de hierro. Sin embargo será necesario realizar estudios adicionales de absorción de hierro en modelos celulares e *in vivo* con el objetivo de confirmar la

capacidad de mejora sobre la biodisponibilidad del hierro por parte de los hidrolizados estudiados.

2. Péptidos con actividad protectora sobre el epitelio gastrointestinal

2.1. Péptidos derivados de caseínas que favorecen la secreción de mucinas

El epitelio gastrointestinal está protegido por una capa, denominada mucus, cuya producción puede estar regulada por diferentes componentes alimentarios. Las mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular, constituyen el principal componente macromolecular del mucus intestinal, siendo las principales responsables de su estructura y de sus propiedades protectoras (Juge, 2012). Los primeros péptidos alimentarios descritos en la bibliografía con capacidad estimulante de la secreción de mucinas intestinales eran péptidos opioides que pertenecían a la familia de las β -casomorfina (Trompette y col., 2003). Sin embargo, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se había observado que los péptidos $^{90}\text{RYLGY}^{94}$ y $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, derivados de la α_{s1} -CN bovina, mostraban un efecto estimulante de la secreción de mucinas en el modelo celular intestinal HT29-MTX (Martínez-Maqueda y col., 2012). Aunque estos péptidos en concreto, no han sido descritos como opioides, sí presentan una estructura favorable para una posible interacción con dichos receptores, mecanismo propuesto hasta el momento como responsable de dicha actividad (Zoghbi y col., 2006). Por todo ello, se planteó el objetivo de evaluar el efecto de distintas secuencias peptídicas derivadas de caseína y del hidrolizado que las contiene, sobre la producción de mucinas en células caliciformes intestinales HT29-MTX.

2.1.1. Caracterización peptidómica del hidrolizado de caseínas lácteas mediante RP-HPLC-MS/MS

En primer lugar, se caracterizó mediante RP-HPLC-MS/MS el hidrolizado de caseínas lácteas. La **Figura 14** muestra los péptidos identificados en el hidrolizado de caseína derivados de la β -CN y α_{s1} -CN. Aunque se identificaron algunos péptidos derivados de κ -CN y α_{s2} -CN, la mayoría de los fragmentos procedían de las dos fracciones caseínicas mayoritarias, β -CN y α_{s1} -CN, alcanzando porcentajes de cobertura para estas proteínas del 80% y 82%, respectivamente. Es necesario señalar, que con las condiciones de análisis empleadas (sin enriquecimiento previo), no es posible detectar secuencias peptídicas fosforiladas pues estas tienen una baja capacidad de ionización en comparación con los péptidos no fosforilados. Debido a esto, se identificaron pocos péptidos en las regiones fosforiladas de las caseínas lo que afecta al porcentaje de cobertura proteica obtenido en nuestro análisis. Se identificaron varias regiones de las proteínas particularmente resistentes a la acción de la pepsina, como aquellas ricas en prolina. Además, el hidrolizado de caseína contenía secuencias estructuralmente homólogas a péptidos descritos con actividad opioide. Concretamente, se identificó el péptido $^{90}\text{RYLGY}^{94}$, de la α_{s1} -CN que es similar al péptido $^{90}\text{RYLGYL}^{95}$ anteriormente descrito con actividad opioide (Loukas y col., 1983). Además se identificaron otras secuencias que si bien no habían sido previamente descritas por su actividad opioide presentaban una estructura similar a la descrita para los péptidos opioides exógenos. En concreto, los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, derivados de la α_{s1} -CN, con dos residuos de Tyr separados por un residuo de Phe, y el péptido $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$ de la α_{s2} -CN, con un residuo de Tyr y Phe en la primera y cuarta posición, tienen estructuras compatibles para la interacción con receptores opioides. Además, los péptidos $^{90}\text{RYLGYL}^{95}$ y $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$

habían sido descritos previamente como secuencias responsables de la actividad antihipertensiva del hidrolizado de caseína (Contreras y col., 2009).

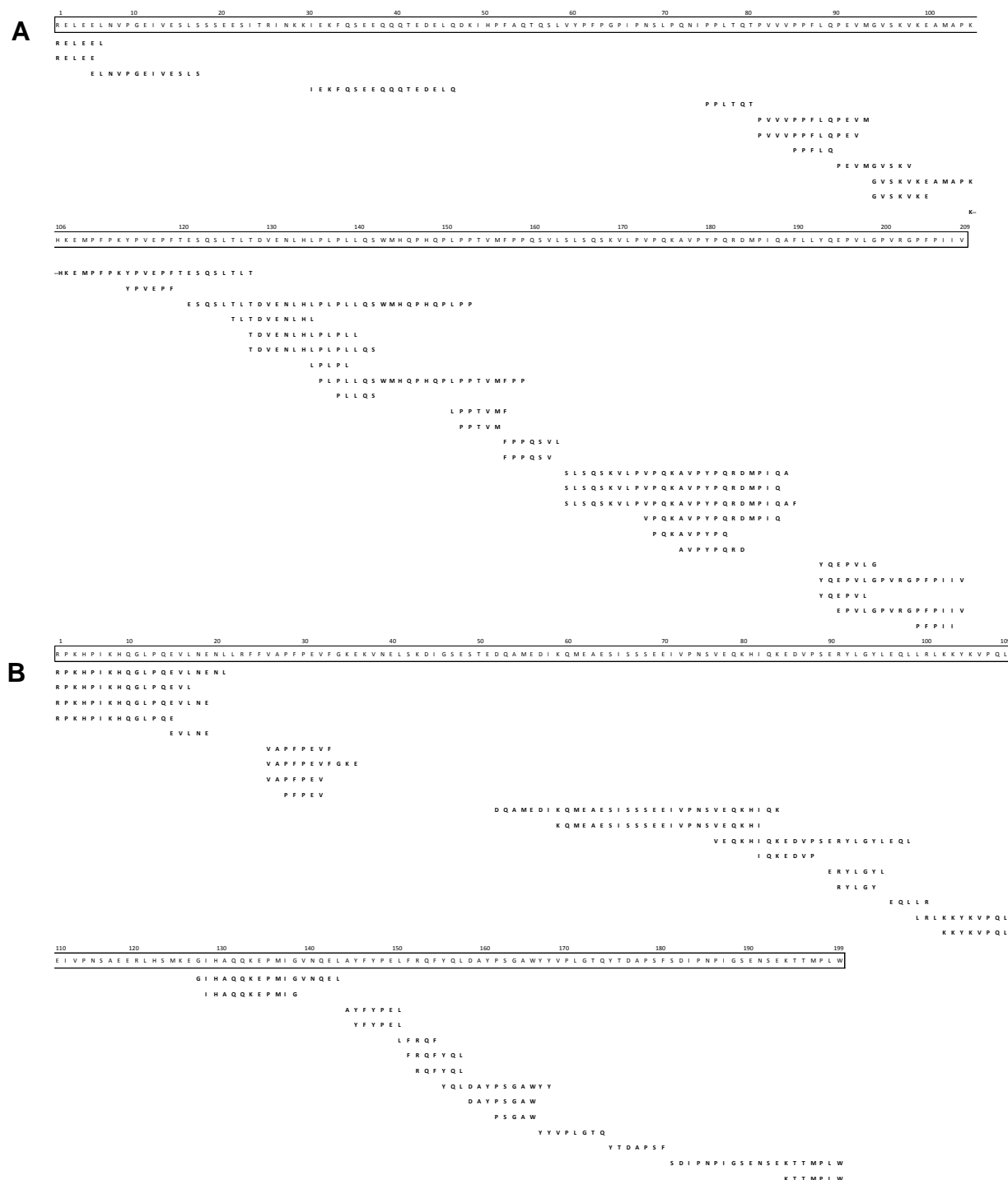


Figura 14. Péptidos identificados en el hidrolizado de caseína con pepsina, derivados de (A) β -CN y (B) α_1 -CN. Los análisis se llevaron a cabo mediante RP-HPLC-MS/MS bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

2.1.2. Efecto de los péptidos sintéticos sobre la expresión de MUC5AC y la secreción de mucinas en células HT29-MTX

Las células HT29-MTX fueron tratadas con los péptidos $^{90}\text{RYLGY}^{94}$, $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, derivados de la $\alpha_{s1}\text{-CN}$, y el péptido $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$, derivado de la $\alpha_{s2}\text{-CN}$, a las concentraciones de 0,5, 0,1 y 0,05 mM. El nivel de ARNm del gen MUC5AC se determinó en las muestras tomadas a distintos tiempos de tratamiento (hasta las 24 h) mediante qRT-PCR (**Figura 15**).

La acción del péptido $^{90}\text{RYLGY}^{94}$ sobre la expresión relativa de MUC5AC dio lugar a valores superiores a 1,7 veces el nivel basal, aunque debido a la variabilidad encontrada, este incremento no fue estadísticamente significativo (**Figura 15A**). Los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ produjeron un aumento en la expresión relativa de MUC5AC, que alcanzó el nivel máximo después de 4 h de exposición, siendo el aumento de 1,74 veces el nivel basal ($p < 0,05$) a la concentración de 0,1 mM en $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ y de 1,79 veces el nivel basal ($p < 0,01$) a la concentración de 0,5 mM en $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ (**Figura 15B y C**). La secuencia $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$ no generó un cambio sustancial en el nivel de expresión de MUC5AC (**Figura 15D**).

Dado que los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ fueron los que originaron un incremento significativo en la expresión relativa de MUC5AC, la secreción de mucinas se determinó en los sobrenadantes de las células sometidas al tratamiento con dichos péptidos (**Figura 16**). En el caso del tratamiento con el péptido $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, los porcentajes máximos de glicoproteína asimilables a mucinas se alcanzaron a las 4 h con un incremento del 162% sobre el control ($P < 0,05$). Para el péptido $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, el efecto sobre la secreción fue del 166% sobre el nivel del control ($P < 0,01$), además de mostrar también un

aumento significativo después de 2 horas de tratamiento, alcanzando un incremento del 152% sobre el nivel del control ($P < 0,05$).

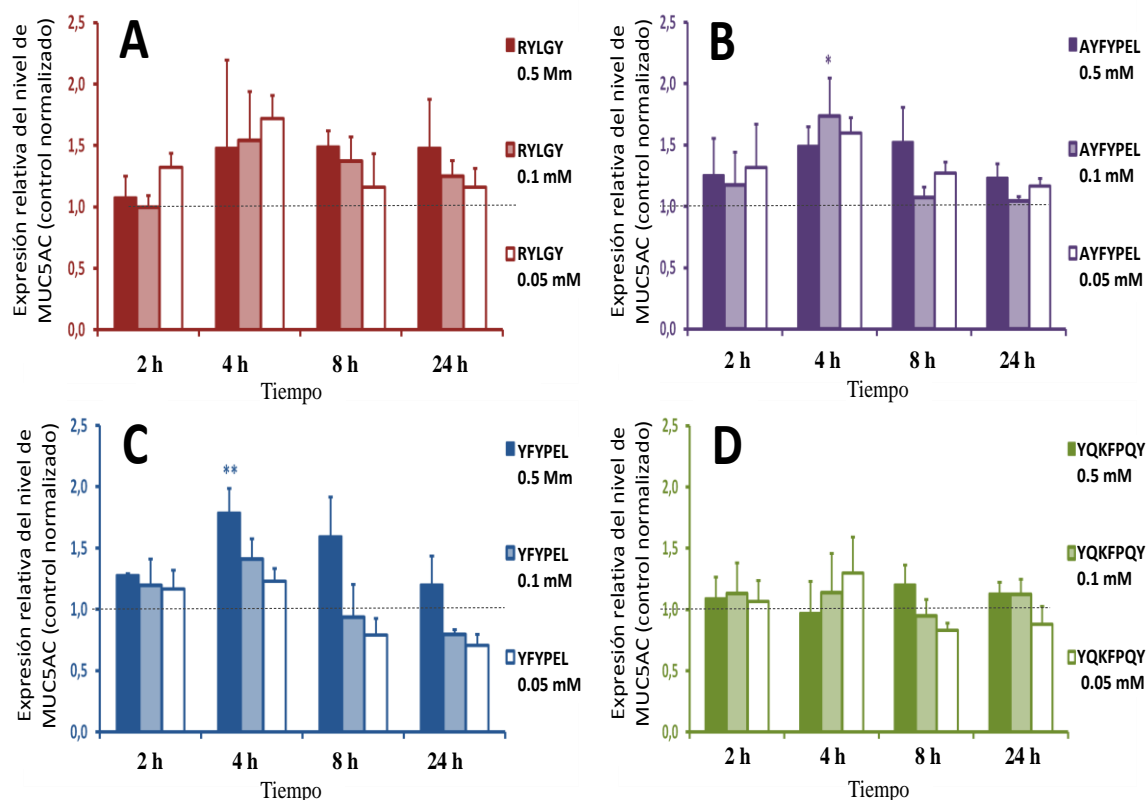


Figura 15. Efecto de los péptidos derivados de α_{s1} -caseína $^{90}\text{RYLGY}^{94}$ (A), $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ (B), $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ (C) y el péptido derivado de α_{s2} -caseína $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$ (D), ensayados a tres concentraciones diferentes (0,05 mM, 0,1 mM y 0,5 mM), sobre el nivel de expresión relativa de MUC5AC en células HT29-MTX determinado por qRT-PCR. Los datos de expresión se presentan normalizados frente al control (células no tratadas), utilizando ciclofilina como gen de referencia. Cada punto representa la media \pm SE de tres repeticiones biológicas ensayadas por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas de cada concentración frente al control se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido por el test de Bonferroni: (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

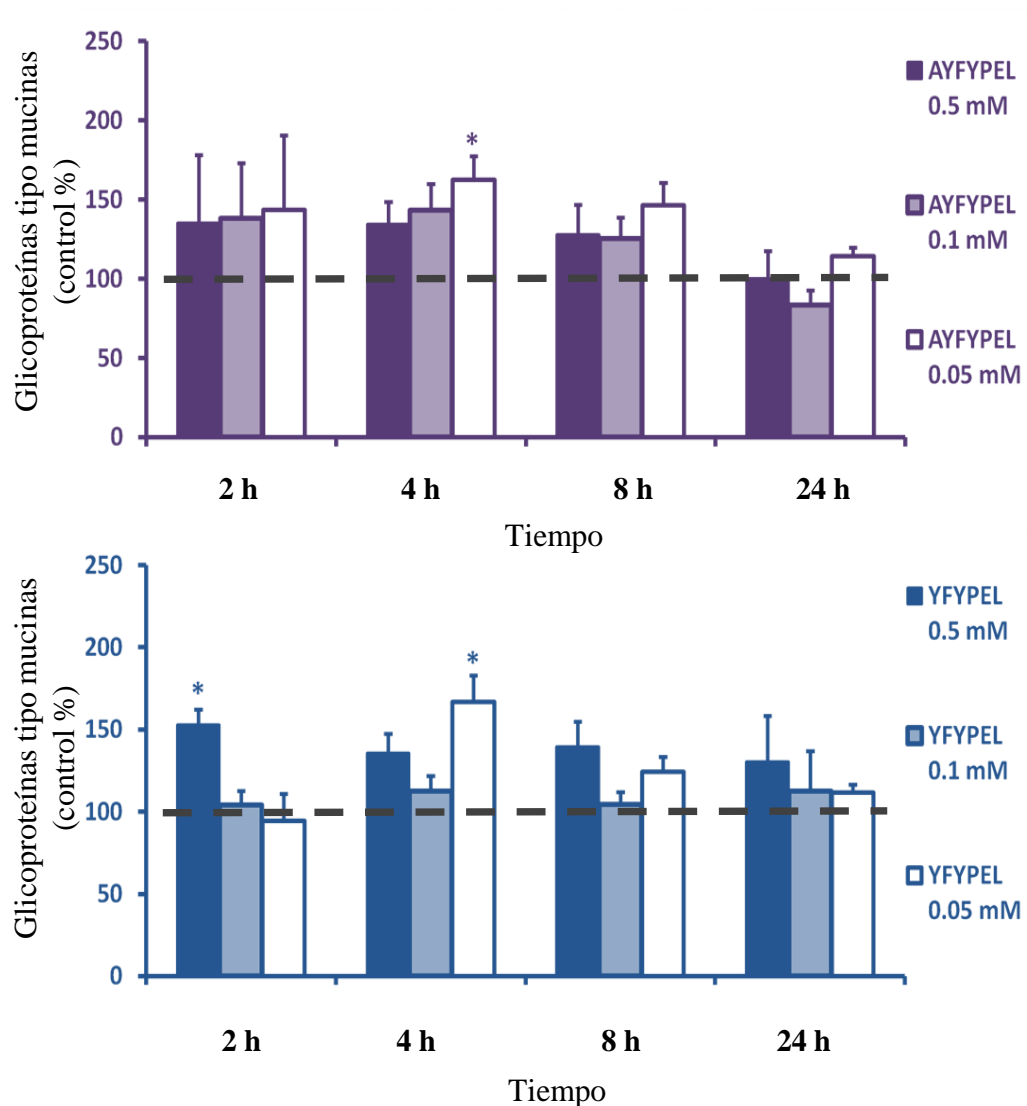


Fig. 16. Efecto de los péptidos derivados de α_{s1} -caseína $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ (A) e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ (B) sobre la secreción de mucinas en las células HT29-MTX. Determinado por ensayo de lectina asociado a enzima y expresado como porcentaje de la cantidad de glicoproteína asimilable a mucinas correspondiente al control (células no tratadas). Cada punto representa la media \pm SE de tres repeticiones biológicas ensayadas por triplicado. Las diferencias significativas de cada concentración frente al control se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls: (*) $P < 0.05$.

2.1.3. Determinación de la estabilidad de los péptidos en el modelo celular HT29-MTX

La estabilidad de los péptidos durante el tratamiento se estudió mediante el análisis de los sobrenadantes celulares por RP-HPLC-MS/MS. Este análisis se realizó con un doble objetivo, estimar la degradación del péptido de partida por la acción de las peptidasas celulares y la identificación de los fragmentos generados a lo largo del tiempo de tratamiento. Tal como se aprecia en la **Figura 17**, los péptidos sintéticos fueron en su mayoría estables hasta las 8 h de tratamiento, detectándose sólo pequeñas proporciones de los nuevos fragmentos identificados. En general, se observó una disminución apreciable de la concentración de los péptidos sintéticos de partida en el medio celular entre las 8 y 24 h, aunque no siempre estuvo acompañada por la formación de nuevos fragmentos peptídicos en modo equiparable. Además de por la hidrólisis ejercida por las peptidasas celulares, los péptidos de partida también podrían disminuir con el tiempo de incubación debido a su localización en la capa superficial de mucina o intracelularmente en las HT29-MTX. El péptido $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ se hidrolizó a la forma $^{145}\text{FYPEL}^{149}$, pero 8 h después de la exposición la degradación era todavía pequeña (un 15% menor del valor determinado a las 2 h). A las 24 h, la disminución observada para $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ fue superior pero se reflejó solo parcialmente en la proporción generada de $^{145}\text{FYPEL}^{149}$. Cabe destacar que a partir del péptido $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, se formó el péptido activo $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, además del péptido $^{145}\text{FYPEL}^{149}$, pero en unas proporciones muy bajas para ser considerado responsable de la actividad observada. Las secuencias $^{90}\text{RYLGY}^{94}$ y $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$ presentaron una estabilidad similar en las primeras 8 h, dando lugar a un único fragmento derivado, $^{91}\text{YLG}^{94}$ y el derivado piroglutámico del péptido parental (793.4 m/z), respectivamente.

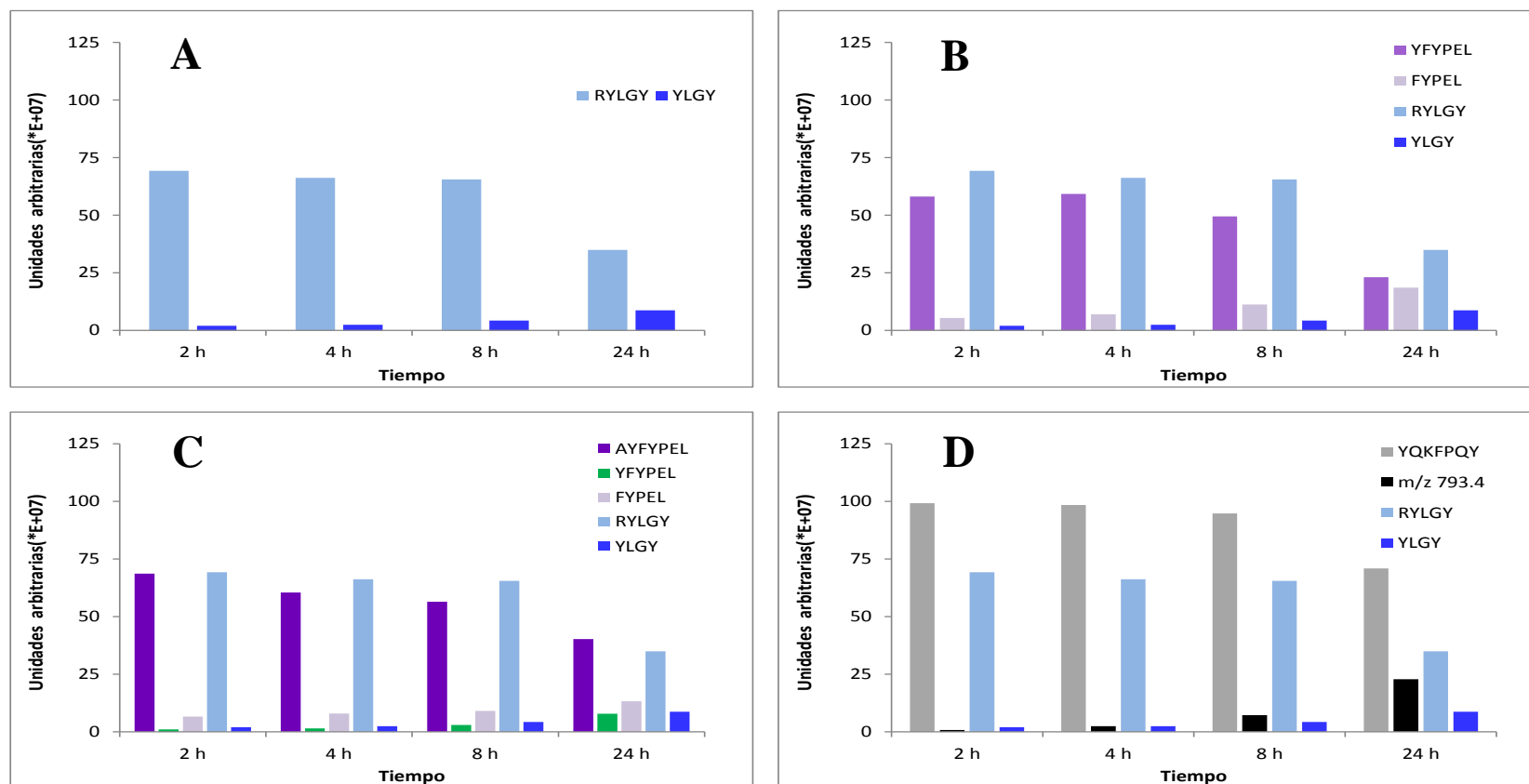


Figura 17. Estabilidad de los péptidos a una concentración inicial de 0,5 mM durante el tiempo de tratamiento a las células HT29-MTX. (A) α_{S1} -caseína $^{90}\text{RYLGY}^{94}$ y el péptido derivado $^{91}\text{YLGY}^{94}$; (B) α_{S1} -caseína $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ y el péptido derivado $^{145}\text{FYPEL}^{149}$; (C) α_{S1} -caseína $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ y péptidos derivados $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ y FYPEL , y (D) α_{S2} -caseína $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$ y el péptido derivado con m/z 793,4. Péptidos identificados en sobrenadantes celulares mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y espectrometría de masas en tándem. Las unidades arbitrarias expresan el área bajo la curva correspondiente al ión molecular y sus aductos de sodio y potasio.

2.1.4. Efecto del hidrolizado de caseína en la expresión de MUC5AC y la secreción de mucinas en células HT29-MTX

Dado el efecto estimulante sobre la expresión de MUC5AC y la secreción de mucinas mostrado por los dos péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, se ensayó el hidrolizado de caseína en el cual habían sido identificados, a dos concentraciones (0,1 y 1% p/v) durante 2, 4, 8 y 24 h de tratamiento (**Figura 18**). El nivel de expresión relativa de MUC5AC aumentó significativamente a las 4 h, con incrementos de 1,8 veces respecto al nivel basal, para las células tratadas con el hidrolizado de caseína a concentraciones de 0,1% y 1,0% p/v. El tiempo de tratamiento al que se determinó la máxima expresión relativa de MUC5AC fue 4 h, coincidiendo así con aquel en el que se dio el mayor efecto estimulante sobre la producción de mucinas por parte de los péptidos sintéticos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$. Cuando se determinó la acción sobre la secreción de mucinas, la mayor respuesta se encontró a las 8 h por parte del hidrolizado ensayado a 0,1% p/v (210% de la cantidad obtenida para las células sin tratar, $P < 0,001$). Los valores de secreción de mucinas registrados para las 24 horas de tratamiento también mostraron un aumento estadísticamente significativo para la concentración de 0,1% p/v de hidrolizado (172% respecto a los controles, $P < 0,01$). No fue posible llevar a cabo la determinación de glicoproteínas asimilables a mucinas en el sobrenadante correspondiente al hidrolizado ensayado a 1% p/v, probablemente debido a la interferencia con los reactivos del método ELLA por parte de péptidos u otros componentes en una concentración más elevada.

La cuantificación en el hidrolizado de los cuatro péptidos estudiados se determinó mediante RP-HPLC-MS/MS. Los valores de riqueza encontrados fueron: 1,93 mg de $^{90}\text{RYLGY}^{94}$, 4,01 mg $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, 2,61 mg de $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ y 2,77 mg de $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$ por g de hidrolizado. Con base a dichos resultados, una dilución del hidrolizado del 1% p/v implicaría concentraciones de los péptidos de 0,029 mM

$^{90}\text{RYLGY}^{94}$, 0,044 mM $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, 0,031 mM $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ y 0,028 mM $^{89}\text{YQKFPQY}^{95}$, valores ligeramente inferiores a la dosis más baja ensayada para los péptidos sintéticos de forma individual (0,05 mM).

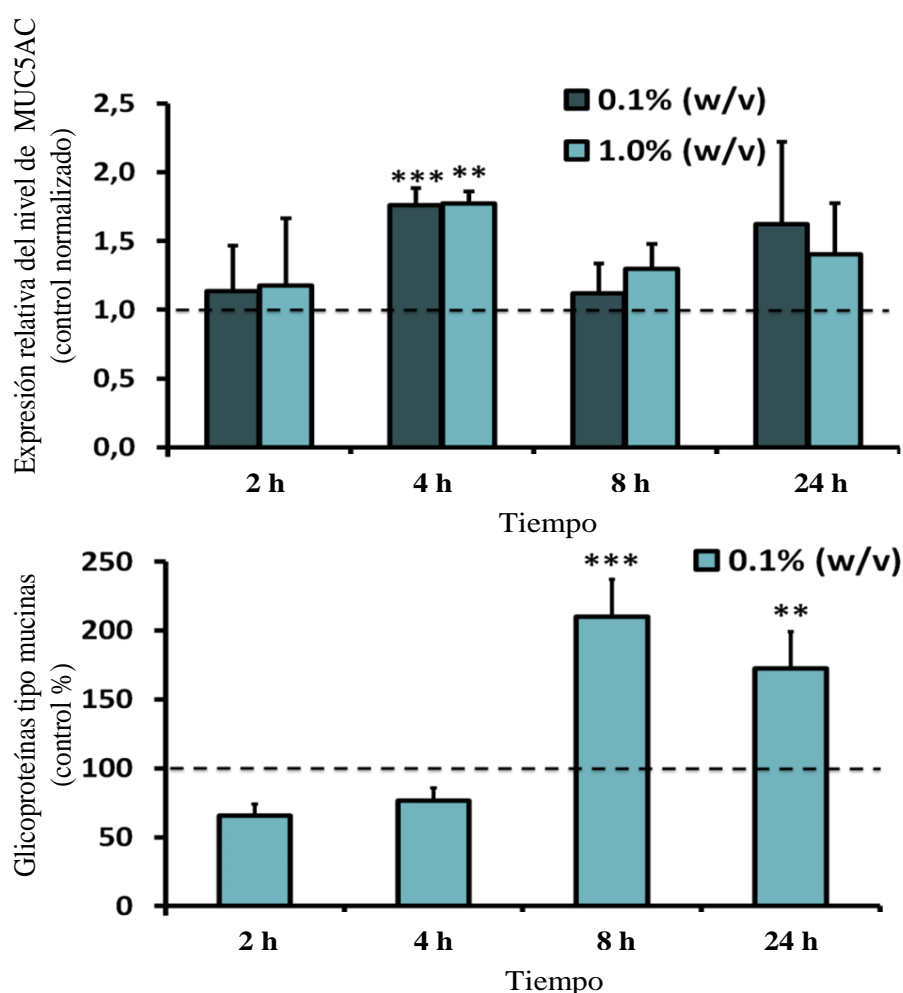


Figura 18. Efecto del hidrolizado de caseína en las células HT29-MTX. A) Expresión relativa de MUC5AC determinado por qRT-PCR después de la adición del hidrolizado en dos concentraciones (0,1% y 1% p/v). Los datos de expresión se presentan normalizados frente al control (células no tratadas), utilizando ciclofilina como gen de referencia. Las diferencias de cada concentración frente al control, se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test Newman-Keuls. B) Secreción de mucinas determinada por ensayo de lectina asociado a enzima y expresada como porcentaje de glicoproteínas asimilables a mucinas respecto al control (células no tratadas) después de la adición del hidrolizado de caseína a la concentración de 0,1% (p/v). Cada punto representa la media \pm SE de tres repeticiones biológicas ensayadas por triplicado. Las diferencias significativas de cada concentración frente al control se determinaron mediante un ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni: (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$.

Los resultados obtenidos confirman la actividad estimulante sobre la producción de mucinas en células caliciformes intestinales humanas HT29-MTX por parte de péptidos derivados de caseína distintos a los ya descritos en la bibliografía procedentes de la β -caseína (β -casomorfina). Todos los péptidos estudiados presentan una estructura favorable para interaccionar con los receptores opioides, ya que tienen Tyr en la primera o segunda posición del extremo N-terminal y un residuo aromático en la tercera y/o cuarta posición. La actividad opioide de los péptidos $^{90}\text{RYLGYL}^{95}$ y $^{90}\text{RYLGYLE}^{96}$ había sido previamente comprobada por Loukas y col. (1983) pero, hasta donde sabemos, el resto de los péptidos ensayados no han sido descritos como péptidos opioides. Tras el estudio de la expresión relativa de MUC5AC mediante qRT-PCR, los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ son los que favorecen en mayor medida la expresión del gen, obteniéndose aumentos en la expresión relativa similares a los previamente descrito para la β -casomorfina 7 (Zoghbi y col., 2006) y la α -lactorfina (Martínez-Maqueda y col., 2012). Los mayores incrementos se obtuvieron tras 4 h de exposición de los péptidos. Este tiempo es claramente inferior a las 24 h que Zoghbi y col., (2006) habían identificado como el óptimo para la estimulación significativa de la expresión de MUC5AC por parte de la β -casomorfina 7.

En el estudio de estabilidad se observó que el péptido $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ se degradaba parcialmente a la forma activa $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ por la acción de las peptidasas celulares. No obstante, la cantidad liberada de $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ a las 4 h no permitía esperar una contribución destacable de este péptido a la actividad estimulante observada para $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$. Cuando se evaluó el hidrolizado de caseína, que contiene los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, el efecto estimulante sobre la secreción de mucinas se observó a un tiempo posterior al cual se produjo la estimulación significativa de la expresión génica (4 h). El efecto del hidrolizado sobre la secreción de mucinas fue mayor

que el encontrado para los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ individualmente (210 % frente al 160 %, aproximadamente). Además, los tiempos de secreción máxima en el tratamiento con el hidrolizado al 0,1 % (8 y 24 h) fueron posteriores a los observados para $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ (4 h) e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ (2 y 4 horas). La concentración de péptidos activos en el hidrolizado al 0,1% fue 10 veces inferior a la que se utilizó en la evaluación de los péptidos de forma separada. Estos resultados sugieren que además de la contribución de los péptidos $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, otros péptidos u otros componentes del hidrolizado podrían actuar de forma sinérgica o a través de un mecanismo no opioide. Por otro lado, se podría pensar que la acción de las peptidasas celulares diera lugar a la liberación de nuevos péptidos, aunque los análisis de los sobrenadantes de los péptidos sintéticos muestran que son mayoritariamente estables durante más de 8 horas.

El efecto observado para el hidrolizado de caseína en la secreción de mucinas y en la expresión de MUC5AC concuerda con los resultados obtenidos por Han y col., (2008), los cuales comprobaron que un hidrolizado de caseína producía un incremento significativo de los niveles de ARNm de Muc3 en el intestino delgado y de la expresión del gen Muc4 en tejido de colon de ratas alimentadas con dicho hidrolizado durante 8 días.

Es importante destacar que algunos de los péptidos ensayados en este trabajo han sido identificados previamente en digeridos gástricos e intestinales humanos tras la ingesta de leche o en simulaciones gastrointestinales *in vitro* de productos lácteos. Es el caso del péptido $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$, que se libera en el estómago humano después de la ingesta de leche o yogur y su forma más corta, $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$, que ha sido detectada en muestras duodenales tras la ingesta de leche (Chabance y col., 1998). Asimismo, ambos péptidos han sido identificados en fórmulas infantiles, leche y en yogur tras la simulación de la digestión *in vitro* (Dupont y col., 2010; Hernández-Ledesma y col., 2007).

2.2. Actividad antiulcerogénica de hidrolizados de proteínas lácteas

Debido a la actividad estimulante de la secreción de mucinas y de la expresión del gen MUC5AC en células intestinales humanas HT29-MTX mostrado por el hidrolizado de caseína nos planteamos evaluar su posible actividad antiulcerogénica en un modelo animal.

El modelo animal seleccionado fue un modelo de ulcerogénesis en ratas inducida por la administración de etanol absoluto, 1 h después de la administración del compuesto a ensayar. En este modelo, el etanol actúa como un agente irritante de la mucosa gástrica, destruyendo inicialmente la capa mucosa compuesta por moco y bicarbonato, y dañando posteriormente el epitelio gástrico, lo que provoca la liberación de especies reactivas de oxígeno y una excesiva respuesta inflamatoria y la consecuente necrosis, edema y hemorragia (Oates y Hakkinen, 1988; Ineu y col., 2008). Además, se han descrito otras actividades ulcerogénicas asociadas al etanol, como la estimulación de la secreción ácida del estómago, el descenso del flujo sanguíneo en la mucosa o la reducción de la producción de PGs (Robert, 1987). Este modelo animal fue empleado en nuestro estudio para evaluar el efecto protector del hidrolizado de caseínas, empleando la caseína sin hidrolizar como control. Además, se ensayó la actividad de un hidrolizado de un concentrado de proteínas de suero enriquecido en β -Lg, que también había demostrado actividad estimulante sobre la secreción de mucinas en células HT29-MTX (Martínez-Maqueda y col., 2013).

2.2.1. Caracterización peptidómica del hidrolizado proteínas de suero enriquecido en β -Lg

De manera similar a lo mostrado anteriormente para el hidrolizado de caseínas se llevó a cabo la caracterización del perfil peptídico del hidrolizado de concentrado de proteínas de suero enriquecido en β -Lg. Como esta proteína no está glicosilada ni fosforilada, que son características estructurales que dificultan la identificación de los péptidos, el

porcentaje de cobertura de la secuencia proteica fue en este caso del 87%, mayor que en el caso del hidrolizado de caseína (**Figura 19**).

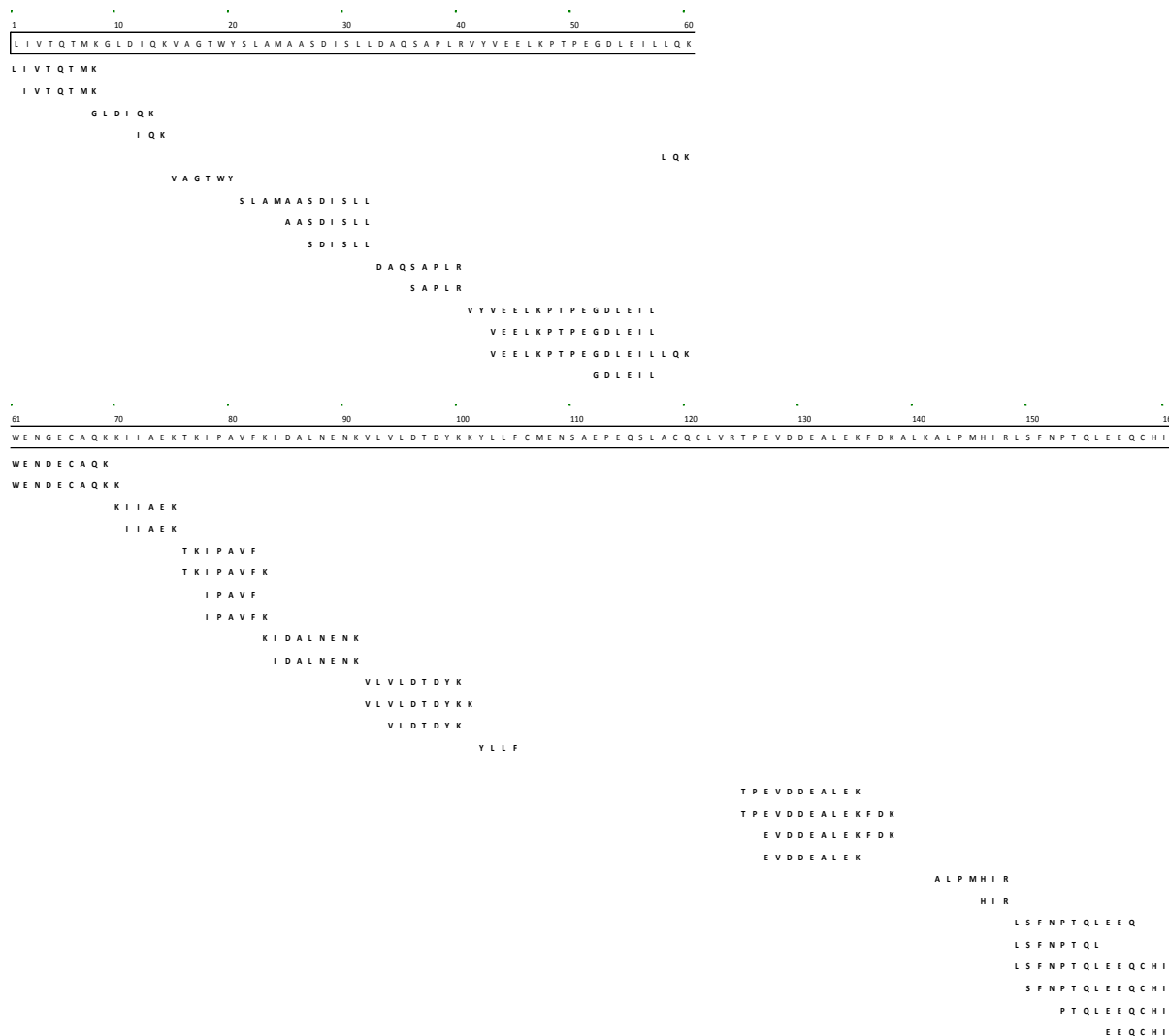


Figura 19. Péptidos identificados en el hidrolizado trípico del concentrado de proteínas de suero enriquecido en β -Lg. Los análisis se llevaron a cabo mediante RP-HPLC-MS/MS bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

Sin embargo, esta proteína contiene dos puentes disulfuro y un grupo tiol libre situado en las posiciones 119 o 121. La presencia de puentes disulfuro da lugar a la formación de heterodímeros unidos por estos puentes, que no han podido ser identificados bajo las condiciones no reductoras de nuestro análisis. Asimismo, se llevó a cabo la cuantificación

del péptido con actividad opioide descrito a partir de la β -Lg, β -lactorfina $^{102}\text{YLLF}^{105}$, utilizando una recta de calibrado con el correspondiente péptido sintético. La cantidad del péptido $^{102}\text{YLLF}^{105}$ fue de 0.68 mg/g de producto sólido.

2.2.2. Evaluación de la actividad antiulcerogénica

La actividad antiulcerativa de la caseína comercial y de su hidrolizado, así como del hidrolizado del concentrado de proteínas de suero, se estudió en el modelo de ulcerogénesis inducida en ratas con etanol absoluto. Los productos fueron administrados una sola vez, a tres dosis (100, 300 y 1000 mg/kg peso corporal del animal) una hora antes de la administración del etanol absoluto. La **Figura 20** muestra, para los diferentes grupos de animales, los valores del índice de lesiones ulcerativas (ILU) y el porcentaje de disminución de las úlceras en comparación con el grupo control al que se le administró solución salina. Todas las muestras ensayadas produjeron descensos significativos de los valores ILU ($P < 0.05$) comparado con el control para las dosis de 300 mg/kg peso y 1000 mg/kg peso del animal. La máxima dosis en todas las muestras tuvo un notable efecto sobre el descenso en las lesiones ulcerativas (56,3-66,3% de descenso del ILU), comparado con el descenso registrado tras la administración del antiinflamatorio carbenoxolona a 200 mg/kg de peso del animal (75,6-92,7% de descenso del ILU). En ambos hidrolizados de encontró cierta relación dosis-dependiente (indicado con diferentes letras en la **Figura 20**). Aunque el hidrolizado de caseína presentó porcentajes de ILU ligeramente más altos, no se pudieron apreciar diferencias significativas entre el efecto antiulcerativo de los tres productos. Cabe destacar, que la caseína sin hidrólisis previa va a ser digerida por acción de la pepsina gástrica *in vivo*, dando lugar a péptidos que pueden ser similares a los obtenidos mediante hidrólisis con pepsina *in vitro*.

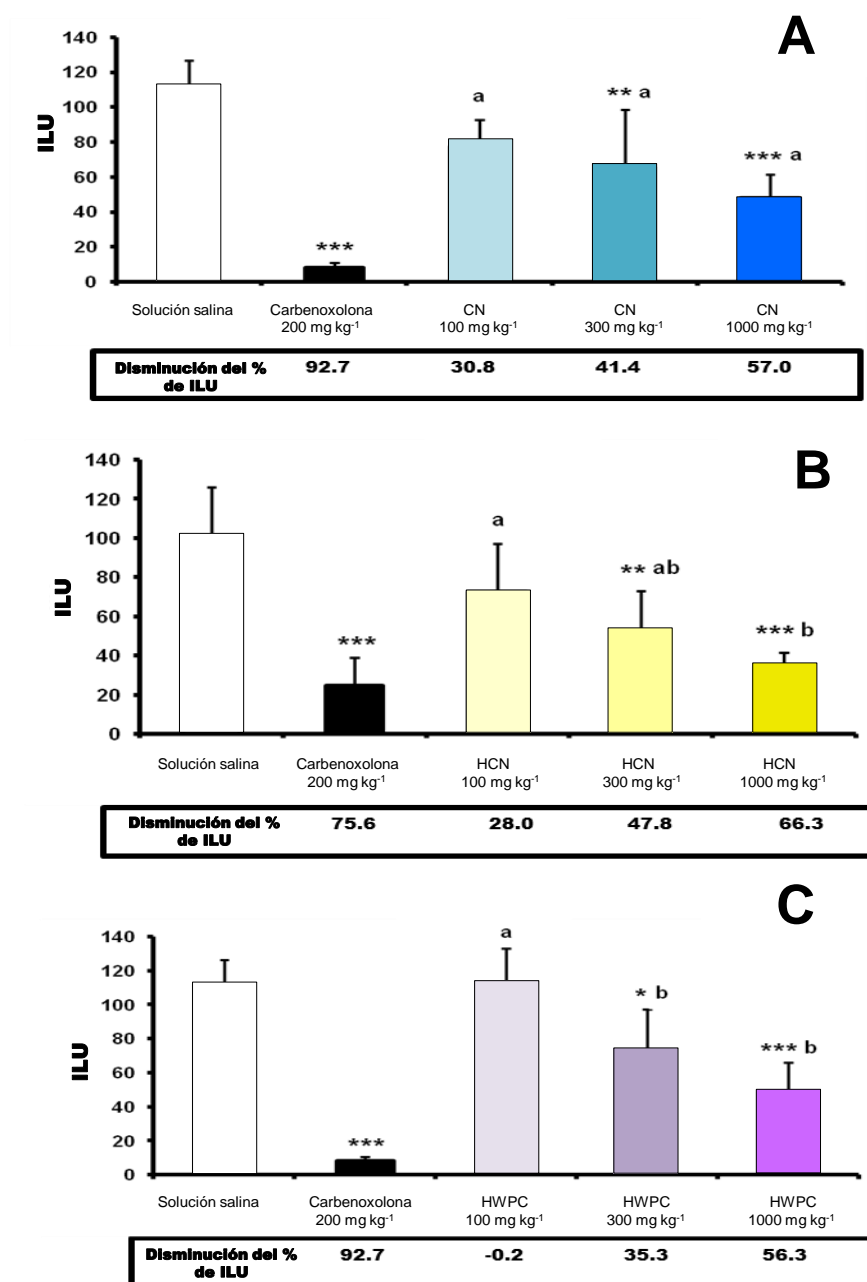


Figura 20. Efecto protector tras la administración aguda de (A) caseína comercial (CN), (B) hidrolizado de caseína (HCN) y (C) hidrolizado de un concentrado de proteína de suero (HWPC) enriquecido en β -Lg frente a las úlceras de estómago inducidas por el etanol absoluto. Este efecto se expresa como índice de lesiones ulcerativas (ILU), dando el valor de la media \pm desviación estándar ($n=5$). Las diferencias se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía seguido de un test de Tukey. Diferencias significativas entre las muestras y el grupo control negativo (solución salina) se reflejan como * ($P<0,05$), ** ($P<0,01$) y *** ($P<0,001$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las dosis ensayadas ($P<0,05$).

Los valores de ED₅₀, que corresponde a la dosis necesaria para producir una reducción del 50% de las lesiones observadas, para las tres muestras, en comparación con la solución salina, fueron 573 mg/kg para CN, 364 mg/kg para CNH y 690 mg/kg para HWPC.

La **Figura 21** muestra las fotografías del estómago de los animales una vez finalizado el experimento, donde pueden observarse claramente las lesiones producidas por el etanol absoluto en forma de estrías de color rojo con diferentes tamaños. La **Figura 21A** corresponde al grupo del control negativo, al que se le administró la solución salina, donde se observa el mayor número de úlceras en la mucosa. Por el contrario, la administración previa de carbenoxolona, un fármaco utilizado para la protección de la mucosa gástrica, hizo que la mucosa mantuviera su integridad a pesar de la acción irritante del etanol, como se muestra en la **Figura 21B**, observándose la mucosa casi normal, con pocas lesiones y sin hemorragias. Las **Figuras 21C, D y E** muestran el efecto protector del hidrolizado de caseína a medida que aumenta su concentración. Como puede observarse en la **Figura 21E**, los daños causados por el etanol fueron limitados bajo la protección del hidrolizado de caseína a la máxima dosis ensayada (1000 mg/kg de peso corporal del animal) en relación con aquellos observados en el grupo control negativo (**Figura 21A**).

Estos resultados ponen de manifiesto la actividad antiulcerogénica de las muestras evaluadas constituidas por proteínas y péptidos lácteos. Estudios previos habían descrito esta misma actividad en otro tipo de compuestos presentes en los alimentos. Por ejemplo, se ha demostrado el efecto protector de los polifenoles frente a las lesiones causadas por algunos agentes ulcerogénicos y por *Helicobacter pylori* (De Jesús y col., 2012; Sumbul y col., 2011).

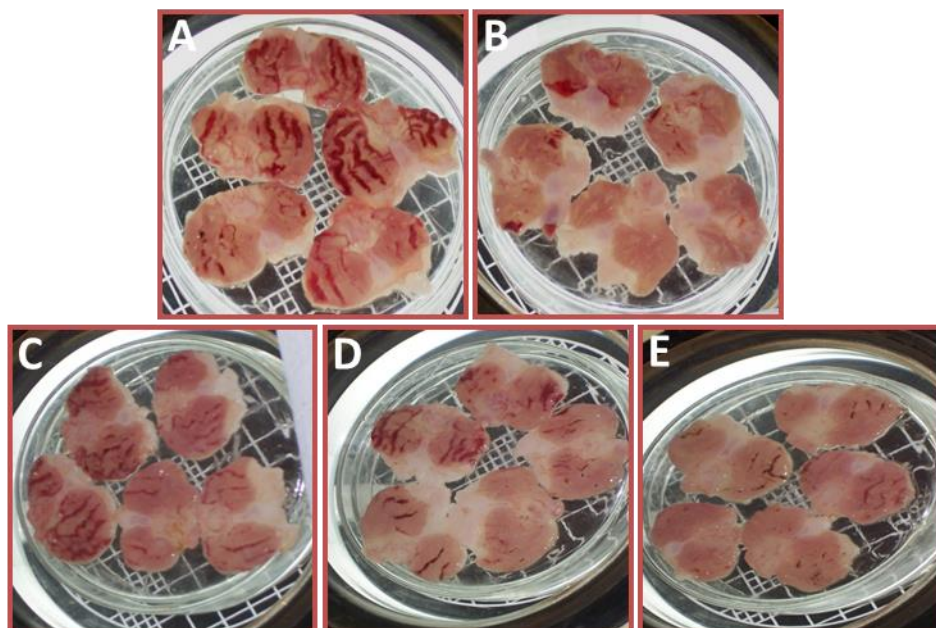


Figura 21. Imágenes de las úlceras de estómago inducidas por el etanol bajo diferentes tratamientos: (A) solución salina (10 ml/kg peso del animal), (B) carbenoxolona (200 mg/kg peso del animal), e hidrolizado de caseína comercial a las dosis de (C) 100 mg/kg peso del animal, (D) 300 mg/kg peso del animal y (E) 1000 mg/kg peso del animal.

Los productos lácteos se han considerado una buena fuente de compuestos con propiedades antiulcerativas. La leche, tanto entera como desnatada ha mostrado actividad protectora en un modelo de ulcerogénesis que emplea ácido clorhídrico en ratas (Dial y Lichtenberger, 1987). Las proteínas de suero y las fracciones peptídicas derivadas han sido descritas como protectoras de la estabilidad de la mucosa gástrica (Pacheco y col., 2006; Rosaneli y col., 2002; Tavares y col., 2011). Según el trabajo de Matsumoto y col. (2001), el efecto protector de los concentrados de proteínas de suero y sus derivados se asocia a su contenido en α -La, cuyos efectos preventivos de las úlceras han sido también demostrados por diferentes autores (Mezzaroba y col., 2006; Ushida y col., 2007). Por ejemplo, Matsumoto y col. (2001) han descrito una inhibición significativa en la formación de úlceras (47% del daño del control) mediada por la ingestión de un aislado de proteínas de suero. Estos autores han evaluado además la contribución de los componentes proteicos

individuales a las concentraciones representativas, encontrando que solo la α -La poseía un efecto comparable al observado para el aislado proteico. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio difieren de la primera hipótesis que indica que la β -Lg no posee propiedades anti-ulcerativas significativas. El concentrado de proteínas de suero comercial empleado en la preparación del hidrolizado estaba enriquecido en β -Lg en más del 99% de la composición proteica total, de acuerdo a nuestros anteriores análisis (Martínez-Maqueda y col., 2013). Por lo tanto, la actividad significativa observada para el hidrolizado del concentrado de proteínas de suero con descensos del ILU entre el 35,3 y el 56,3% a las dosis de 300 y 1000 mg/kg peso corporal, respectivamente, no pueden ser atribuidas a la α -La o a fragmentos derivados de esta proteína, mientras que sí pueden deberse a péptidos derivados de la β -Lg o a otros compuestos de naturaleza no proteica. Pacheco y col. (2006) han descrito una respuesta protectora comparable para el hidrolizado de proteínas de suero con enzimas pancreáticas (descenso del ILU del 65,5% tras la administración aguda a una dosis de 1000 mg/kg peso corporal), aunque es preciso indicar que el concentrado inicial contenía una considerable cantidad de α -La (Borges y col., 2001). De todos modos, los resultados encontrados en nuestro estudio son similares a los datos recogidos por Matsumoto y col. (2001) que establecieron que bajas dosis de β -Lg (100 mg/kg peso corporal) no ejercen ningún efecto protector frente a las lesiones inducidas por el etanol. Se encontraron mayores discrepancias en el caso de la caseína, ya que Matsumoto y col. (2001) no observaron efectos antiulcerativos de la caseína bovina a la dosis de 200 mg/kg peso corporal del animal (9% de descenso del ILU). No conocemos que existan más estudios publicados sobre la actividad antiulcerativa de la caseína o de los hidrolizados obtenidos a partir de ella. En nuestros experimentos, la menor dosis empleada de 100 mg/kg peso corporal ya provocó una reducción de las lesiones ulcerativas tres veces superiores (30,8% ILU respecto a 9%) a los datos previamente descritos. Las discrepancias

entre los trabajos pueden deberse a múltiples factores como el tiempo de pre-tratamiento antes de la administración de etanol (30 minutos respecto a 60 minutos en nuestro estudio), la concentración de etanol (60% respecto a etanol absoluto en nuestro estudio) o el criterio del análisis de las úlceras (longitud de la lesión respecto a la metodología seguida en nuestro estudio de acuerdo a Gamberini y col., (1991). Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que la caseína puede ejercer un importante efecto protector frente a las lesiones ulcerativas, aunque se necesitarían más estudios en animales para respaldar este efecto.

2.2.3. Evaluación de la contribución de los grupos sulfhidrilo a la actividad antiulcerogénica

Con el objetivo de evaluar si la actividad antiulcerativa observada para la caseína y su hidrolizado y el hidrolizado del WPC estaba mediada por la acción protectora de los grupos sulfhidrilo (SH) endógenos, se realizó un ensayo *in vivo* usando NEM como inhibidor. Previamente ha sido descrito que los agentes protectores de la mucosa gástrica contienen compuestos sulfhidrilo (Szabo y col., 1992). Para ello, se empleó el mismo modelo de ulcerógenes inducida con etanol absoluto, pero inyectando a las ratas, por vía subcutánea, NEM (10 mg/kg de peso del animal), 30 minutos antes de la administración intra-gástrica de solución salina (control negativo) o hidrolizado (una única concentración de 300 mg/kg del hidrolizado de caseína y 500 mg/kg del hidrolizado del concentrado de proteínas de suero). El NEM es un compuesto capaz de bloquear, vía alquilación los grupos SH activos endógenos en el modelo animal empleado (Szabo y col., 1983).

En la **Figura 22** se muestra el ILU para cada tratamiento y su reducción respecto al grupo de referencia. Se observó que la alquilación de los grupos SH endógenos aumentaba la susceptibilidad de la mucosa a las lesiones inducidas por etanol. Así, para el grupo de

control salino, los valores de ULI aumentaron de 81,2 a 137,8 cuando se inyectaba previamente NEM.

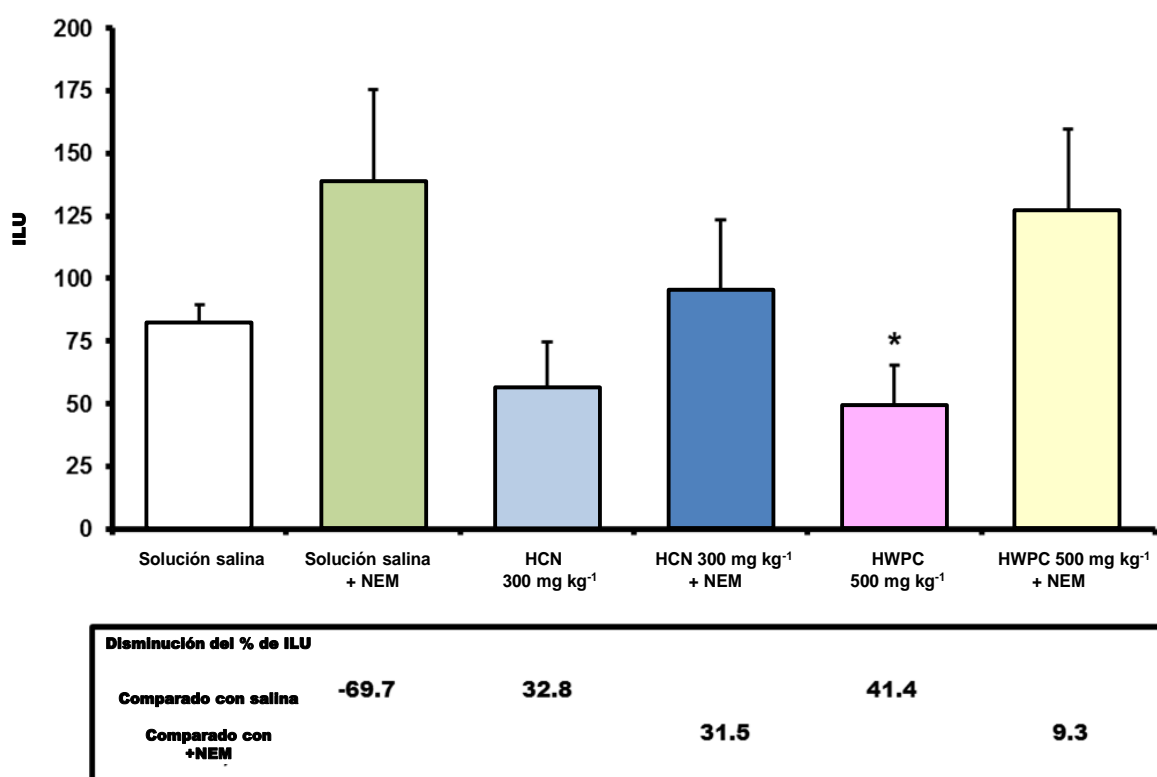


Figura 22. Efecto protector de N-etilmaleimida (NEM), administrada por inyección subcutánea a la dosis de 10 mg/kg de peso corporal, frente a las úlceras de estómago inducidas por etanol absoluto, en un tratamiento agudo con el hidrolizado de caseína comercial (HCN) y el hidrolizado del concentrado de proteínas de suero (HWPC). Este efecto se expresa como índice de lesiones ulcerativas (ILU), dando el valor medio \pm desviación estándar ($n=5$). Las diferencias se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía seguido de un test de Tukey. Diferencias significativas entre las muestras y el grupo control negativo se reflejan como * ($P < 0,05$).

La actividad antiulcerogénica del hidrolizado de caseína no fue significativamente diferente entre ambas condiciones, con y sin NEM, y el descenso de ULI respecto a su correspondiente control (solución salina y solución salina con NEM, respectivamente) estuvo alrededor del 30%, en ambos casos, lo que indica que el mecanismo de protección no estaba mediado por los grupos SH. Sin embargo, en el caso del hidrolizado del concentrado de proteínas de suero, la inhibición observada cuando las ratas recibieron

NEM disminuyó notablemente (pasando del 41,3 al 9,2% de reducción). Estos resultados indican que los grupos SH activos presentes en el hidrolizado de proteínas de suero jugaron un papel importante en la protección de la mucosa frente a las lesiones inducidas por el etanol.

La **Figura 23** muestra visualmente las consecuencias del pre-tratamiento con NEM en la integridad de la mucosa después de la administración del etanol absoluto. Las **Figuras 23B, D y F**, que corresponden a los animales previamente tratados con NEM, muestran que los órganos están más dañados que los que se recogen en las **Figuras 23A, C, y E**, respectivamente.

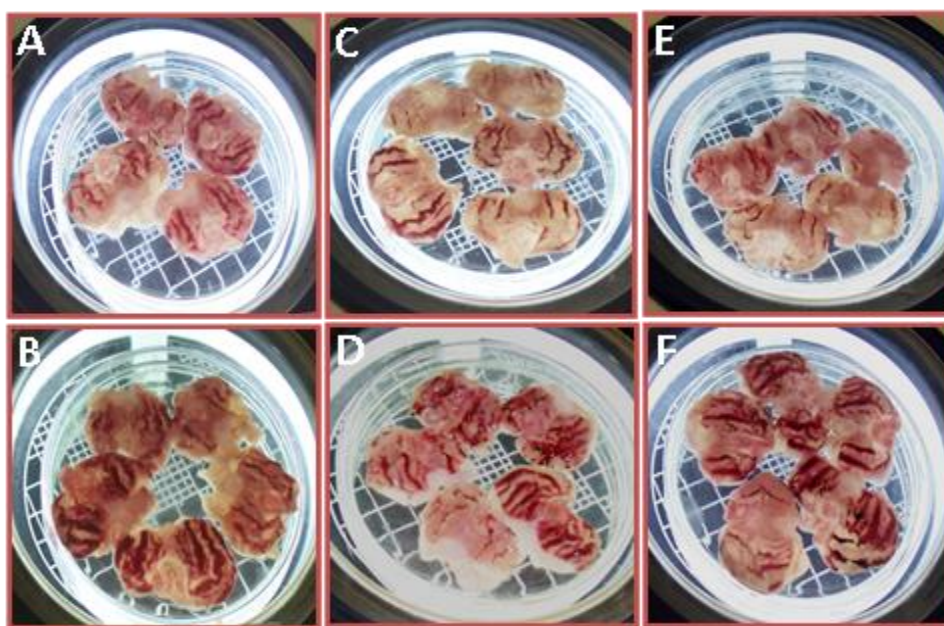


Figura 23. Imágenes de las úlceras de estómago inducidas por el etanol con y sin previa inyección de N-etilmaleimida (NEM) a 10 mg/kg de peso corporal. Tratamientos: (A) solución salina (10 ml/kg peso corporal + NEM), (B) hidrolizado de caseína comercial (300 mg/kg peso corporal), (C) hidrolizado de caseína comercial (300 mg/kg peso corporal + NEM), (D) hidrolizado del concentrado de proteína de suero (500 mg/kg peso corporal) y (E) hidrolizado del concentrado de proteína de suero (500 mg/kg peso corporal + NEM).

El GSH representa la principal fuente de grupos SH no proteicos endógenos en la mucosa gástrica y es capaz de actuar junto con algunas PGs para proteger dicha mucosa

(Szabo y col., 1992). Por tanto, se ha descrito el importante papel citoprotector ejercido por el GSH frente a la formación de la úlcera péptica (Potrich y col., 2010). Estudios previos habían demostrado que las propiedades protectoras asociadas a las proteínas de suero o a sus hidrolizados lo eran a través de los grupos SH activos. Así, los estudios de Rosaneli y col. (2002) y Pacheco y col., (2006) demostraron para un concentrado de proteínas de suero y su correspondiente hidrolizado con pancreatina, un importante descenso de la protección gástrica cuando se bloqueaban los grupos SH endógenos. Mezzaroba y col. (2006) detectaron una similar prevención de la inhibición para la α -La y dos fracciones de sus hidrolizados cuando las ratas se trataban con NEM. Por otra parte, Tavares y col., (2011) han encontrado que las fracciones con péptidos de menor peso molecular contribuyen en mayor medida a la actividad antiulcerogénica del SH activo endógeno que los hidrolizados de proteínas de suero completos.

La estimulación de la producción de mucinas podría representar un mecanismo en la defensa de la mucosa gástrica. La capa de moco gástrica cubre la mucosa del estómago y constituye una barrera física entre el lumen y el tejido del estómago. Las mucinas son los principales responsables de las propiedades viscosas del moco. Las mucinas más abundantes son MUC5AC y MUC6, siendo MUC5AC el componente principal de la capa de moco mientras que MUC6 puede desarrollar otras actividades como la actividad antibiótica frente a *H. pylori* (Niv y Boltin, 2012). Considerando nuestros resultados respecto a la secreción de mucinas y sobre la expresión del gen MUC5AC se puede afirmar que los péptidos alimentarios pueden jugar un papel importante en la protección de la mucosa a través de la estimulación de la secreción de moco. De manera que el fortalecimiento del moco puede contribuir a la actividad antiulcerativa, concretamente es el caso CNH cuyo efecto protector parece ser independiente de los grupos SH activos. Es importante destacar, que los péptidos con actividad sobre la secreción de mucinas en

células caliciformes intestinales, $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ e $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ pueden formarse durante la digestión gastrointestinal de las caseínas. De hecho, nuestro grupo y otros autores han encontrado estas secuencias en simulaciones de la digestión gastrointestinal de diferentes productos lácteos (Hernández-Ledesma y col., 2007; Dupont y col., 2010b). Además, el péptido $^{143}\text{AYFYPEL}^{149}$ se había identificado en estómago y el $^{144}\text{YFYPEL}^{149}$ en un estudio en humanos tras la administración oral de leche o yogur (Chabance y col., 1998).

Independientemente de las interacciones con los receptores opioides, la liberación de mucina gástrica se ha relacionado con la producción de PGE_2 (Phillipson y col., 2008). La acción de la $\alpha\text{-La}$, como agente antiulcerativo, se basó inicialmente en su protección a la mucosa gástrica respecto a las úlceras provocadas por etanol o por lesión inducida por indometacina a través de la estimulación simultánea de PGE_2 y aumento de la mucosidad (Mezzaroba y col., 2006), aunque un estudio posterior *in vitro* sugirió que su efecto productor de mucinas era independiente de la PGE_2 endógena (Ushida y col., 2007).

Castro y col., (2010) han descrito que dos hidrolizados de colágeno bovino y porcino aumentaban la secreción de moco gástrico pero su efecto antiulcerogénico en un modelo de úlceras inducidas por etanol absoluto revertía previa alquilación de los grupos SH con NEM. La secreción de mucinas y las propiedades antiulcerativas observadas en algunos compuestos derivados de alimentos, junto con estos resultados obtenidos para los hidrolizados de caseína y de proteínas de suero confirman que el fortalecimiento del moco es un mecanismo a tener en cuenta en la función protectora en el caso de las úlceras gástricas inducidas por etanol. Sin embargo, son necesarios llevar a cabo más estudios sobre péptidos individuales con actividad sobre la secreción de mucinas en ratas e identificar los componentes activos en la protección de la mucosa gástrica.

2.3. Papel protector del inhibidor de Bowman-Birk en la digestión de la lunasina

La lunasina es un péptido que ha demostrado efecto quimiopreventivo, antioxidante y anti-inflamatorio en diversos modelos celulares y animales (Fernández-Tomé y col., 2014). Este péptido, una vez ingerido, puede ejercer sus propiedades *in situ* a nivel local o bien, a nivel sistémico, para lo cual requiere resistir el ataque proteolítico de las enzimas digestivas, ser absorbido a través del tracto gastrointestinal y llegar a los órganos y tejidos diana en una forma intacta y activa. Los primeros estudios sugirieron el papel protector que ejercen los inhibidores de proteasas, KTI, frente a la digestión de la lunasina por acción de las enzimas digestivas (Hernández-Ledesma y col., 2009). Sin embargo, debido a la falta de datos que confirmen este papel protector, nos planteamos llevar a cabo un estudio sobre el comportamiento de la lunasina bajo condiciones fisiológicas que simulen su tránsito a través del tracto gastrointestinal en ausencia o presencia de IBB1, tanto en su estado activo como inactivo.

2.3.1. Caracterización de la lunasina y el IBB1 activo e inactivo

El BBI comercial es una mezcla de dos isoformas denominadas IBB1 e IBBD2, que se diferencian en la potencia y la especificidad frente a las enzimas tripsina y quimotripsina. En el presente estudio, se aisló la isoforma IBB1 mediante cromatografía de intercambio catiónico. Desde el punto de vista funcional, IBB1 demostró una alta capacidad para inhibir la acción de la tripsina y la quimotripsina, con valores de la constante de afinidad por la enzima (K_i) de $30 \text{ nM} \pm 4$ y $3 \text{ nM} \pm 1 \text{ nM}$, respectivamente. Su actividad inhibidora específica frente a la tripsina fue de 3828 ± 209 unidades inhibidoras de tripsina/mg de proteína y frente a la quimotripsina, de 2917 ± 292 unidades inhibidoras de quimotripsina/mg de proteína. Después de la reducción de los enlaces disulfuro y la

posterior alquilación de los grupos sulfhidrilo, la actividad inhibitoria de esta isoforma frente a ambas enzimas disminuyó más del 95%.

El análisis de la isoforma IBB1 en estado inactivo por RP-HPLC-MS/MS reveló la presencia de un pico mayoritario correspondiente a la isoforma reducida/alquilada, y un pico minoritario, que representó el 2% del IBB1 total, correspondiente al isoinhibidor activo. Estos resultados indicaron que un pequeño porcentaje de IBB1 permaneció activo tras el proceso de inactivación.

2.3.2. Efecto de la digestión gástrica sobre la lunasina

Con el fin de evaluar el comportamiento de la lunasina frente a la acción de las enzimas digestivas en presencia o ausencia del isoinhibidor de BBI, se prepararon mezclas de lunasina y de IBB1, tanto en su estado activo como inactivo, con diferentes proporciones (p/p) de ambos polipéptidos. Las mezclas se sometieron a un proceso de hidrólisis en dos etapas secuenciales simulando las condiciones de digestión gastrointestinal. La **Figura 24A-24D** muestra los cromatogramas de los digeridos obtenidos a partir de las distintas mezclas tras la fase gástrica.

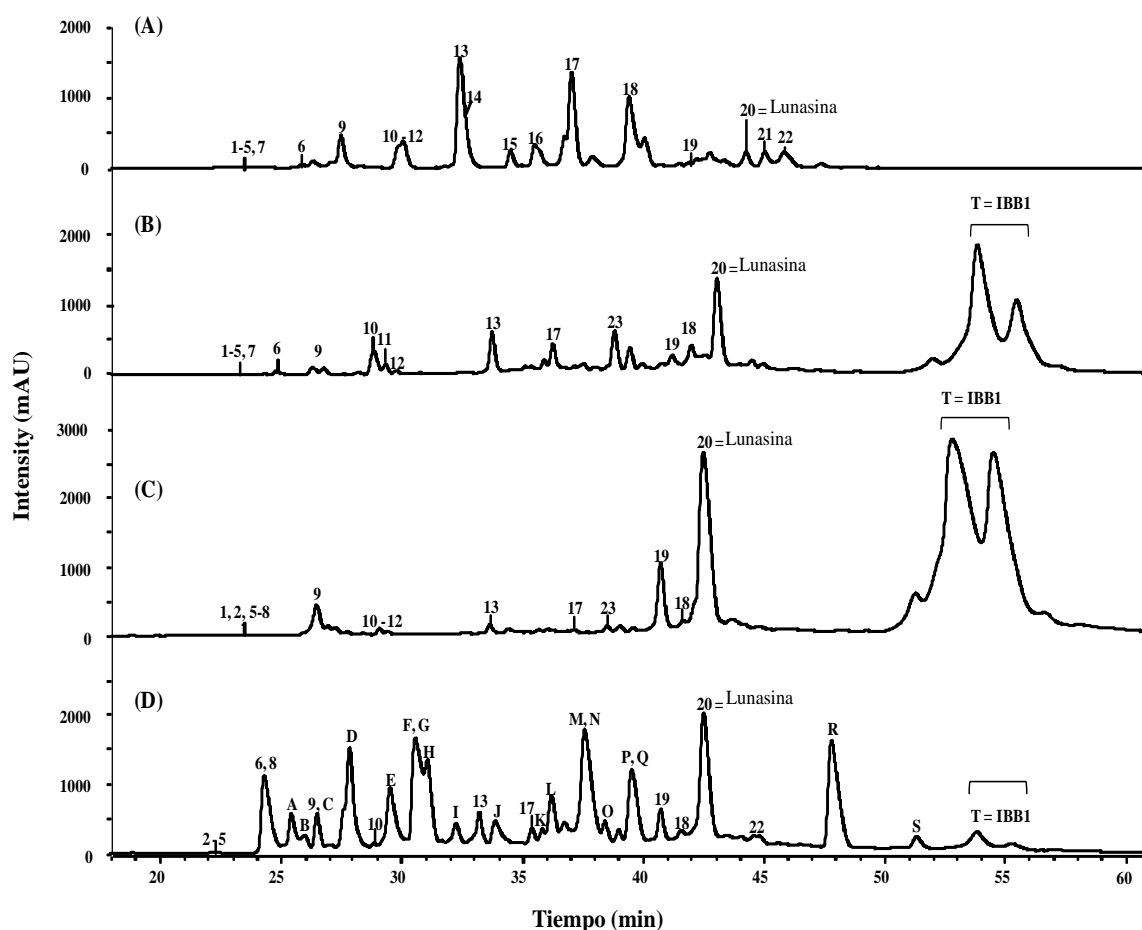


Figura 24. Cromatogramas obtenidos tras el análisis mediante HPLC de los digeridos de las mezclas lunasina:IBB1 a diferentes proporciones (p:p) (A) 1:0, (B) 1:1, (C) 1:2, y (D) 1:2 con IBB1 inactivo tras ser sometidos a la fase gástrica simulando las condiciones fisiológicas. Los picos cromatográficos, números y letras, corresponden a lunasina e IBB1 con sus péptidos derivados, respectivamente. La identificación se realizó por espectrometría de masas en tándem.

La elución de la lunasina y el IBB1 tuvo lugar a los 42 y 52 minutos, respectivamente. Los iones encontrados en estos tiempos de retención, con masas experimentales de 5028,3 para la lunasina (masa teórica de 5028,0) y 7858,6 para el IBB1 (masa teórica de 7858,8) confirmaron la identidad de ambos polipéptidos. Además, se observó un pico al tiempo de retención de 55 minutos cuyos iones y masa experimental indicaron la presencia de IBB1 careciendo del tetra-péptido $^{68}\text{DKEN}^{71}$ en el extremo C-terminal (masa teórica de 7380,9).

El porcentaje de lunasina intacta después de la digestión con pepsina se calculó mediante el uso de una curva estándar de la lunasina, preparada con concentraciones de este péptido en el rango entre 0,125 y 1,5 mg/mL y analizada en las mismas condiciones (Tabla 10).

Tabla 10. Lunasina intacta (expresada como % de lunasina intacta inicial) medida en los digeridos obtenidos tras la fase gástrica e intestinal del proceso de simulación de la digestión gastrointestinal de lunasina:IBB1 en diferentes proporciones (p/p). Las digestiones y el análisis de RP-HPLC-MS/MS para cada digestión se realizaron por duplicado.

Lunasina:IBB1 proporción (p:p)	Lunasina intacta (%)	
	Digestión gástrica	Digestión gástrica + Intestinal
1:0	2,6 ± 0,4 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
1:1	34,3 ± 3,7 ^b	1,8 ± 0,4 ^b
1:2	35,1 ± 2,8 ^b	5,3 ± 0,4 ^c
1:2 (IBB1 inactivo)	28,4 ± 3,6 ^b	1,5 ± 0,2 ^b

^{a-c} Letras superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P <0,05).

En ausencia del IBB1, sólo el 2,6% de la lunasina resistió a la acción de la pepsina, lo que indicó la alta susceptibilidad de este péptido a esta enzima. Estudios previos ya habían sugerido la capacidad de la pepsina para degradar la lunasina, aunque el porcentaje de péptido residual obtenido después de la incubación con esta enzima difirieron en cada estudio (Jeong y col., 2007c; Park y col., 2007; Hernández-Ledesma y col., 2009). Las discrepancias entre los diferentes trabajos pueden deberse a múltiples factores, como la presencia de otros inhibidores de proteasas, como el KTI y el isoinhibidor IBBD2, las diferencias en la proporción de lunasina:BB1 de las mezclas sometidas a la acción de la

pepsina, así como, la metodología empleada para evaluar el porcentaje de la lunasina residual. En nuestro estudio, se ha empleado MS/MS para cuantificar la lunasina residual tras la fase gástrica e intestinal, que presenta ventajas de resolución y sensibilidad en comparación con los métodos de Western Blot y ELISA (Guijarro-Díez y col., 2014; Nakurte y col., 2012). Además, esta técnica ha permitido identificar, por primera vez, los péptidos derivados de la lunasina tras la acción de la pepsina.

Como se muestra en la **Tabla 10**, en presencia de IBB1 en las proporciones lunasina:IBB1 de 1:1 y 1:2, más del 34% de la lunasina permaneció intacta sin observarse diferencias estadísticas significativas entre ambas proporciones tras la digestión con pepsina. Asimismo, al comparar las mezclas de lunasina:IBB1 inactivo con las muestras que contenían IBB1 activo no se observaron diferencias significativas, permaneciendo más del 28% de la lunasina en estado intacto después de la fase gástrica. Este hecho podría explicarse por la existencia de un pequeño porcentaje de IBB1 que permaneció activo después del proceso de inactivación, y que pudo ser capaz de proteger a la lunasina de los efectos de la pepsina (**Figura 25D**). Además, debido al mayor tamaño del IBB1 en comparación con la lunasina, este isoinhibidor podría actuar envolviendo a la lunasina y protegiéndola del ataque de la pepsina. Sin embargo, la protección no parece estar asociada con la inhibición de la pepsina por parte del IBB1 dado que su actividad inhibidora sobre esta enzima es nula o extremadamente baja (Hajela y col., 1999; Maggo y col., 1999).

Al comparar los perfiles peptídicos de los diferentes digeridos obtenidos tras la fase gástrica, se observó que los obtenidos en presencia de IBB1 activo a ambas proporciones (1:1 y 1:2, p/p) fueron similares. Sin embargo, diferían del perfil propio del digerido obtenido para las muestras que no contenían el IBB1, lo que indicó que el tipo de péptidos

liberados tras la acción de la pepsina eran diferentes según la presencia o ausencia del isoinhibidor.

Los péptidos liberados a partir de la lunasina y del IBB1 se identificaron mediante RP-HPLC-MS/MS, y se muestran en la **Tabla 11** y la **Figura 26A-D** aquellos derivados de la lunasina; y en la **Tabla 11** y la **Figura 26**, aquellos derivados del IBB1 inactivo. Cabe señalar que en este estudio no se identificaron péptidos derivados del IBB1 en su estado activo. Este hecho confirma la resistencia del isoinhibidor a la acción de la pepsina. En este sentido, es bien conocido el papel que desempeña la red de puentes disulfuro presente en el IBB1 en el mantenimiento de su correcto plegamiento y estructura funcional, siendo por tanto responsable de su resistencia a la acción de las proteasas digestivas y al tratamiento térmico (Clemente y col., 2008; Marín-Manzano y col., 2009; Trivedi y col., 2009). Igualmente, se ha descrito el efecto causado por la reducción de los puentes disulfuro y la alquilación de los grupos sulfhidrilo sobre la conformación estructural del IBB1 y la correspondiente pérdida de su resistencia a la acción de las enzimas y las altas temperaturas (Clemente y Arques, 2014).

Nuestro estudio confirma que, después de la inactivación del IBB1 por reducción/alquilación, puede observarse una pequeña cantidad de este isoinhibidor en el digerido gástrico, siendo suficiente para proteger a la lunasina de la acción de la pepsina. Nuevamente, el mayor tamaño del isoinhibidor pudo ser determinante en la protección ejercida frente a la pepsina, aunque no se descarta que los péptidos liberados a partir del IBB1 inactivo pudieran contribuir también al efecto protector. En los digeridos obtenidos tras la fase gástrica pudieron identificarse 22 péptidos derivados de la lunasina y 19 derivados del IBB1 inactivo, aunque la presencia o ausencia de cada uno de estos péptidos dependió de la muestra digerida (**Figuras 24 y 25**). Como era de esperar, la mayoría de los

fragmentos derivados de la lunasina (20 del total de 22 péptidos) fueron identificados en el digerido obtenido de la mezcla que no contenía IBB1. Cinco de estos péptidos, correspondientes a la secuencias ¹¹RKQLQGVNLTPCEKHIME²⁸, ¹⁷VNLTPCEKHIME²⁸, ¹⁹LTPCE²³, ²⁰TPCEKHIME²⁸ y ²¹PCEKHIME²⁸, sólo pudieron identificarse en los digeridos que no contenían IBB1, no observándose en los digeridos procedentes de las mezclas que contenían el isoinhibidor en su estado activo. Estos fragmentos están situados en la región central de la lunasina situada entre los aminoácidos 11 y 28, lo que indica que esta área podría estar preferentemente protegida de la acción de la pepsina cuando el isoinhibidor de la proteasa está presente (**Figura 25A-D**).

En la digestión gástrica de las mezclas de lunasina:IBB1 inactivo a la proporción (1:2) se identificaron 19 péptidos derivados del IBB1 inactivo (**Figura 25A** y **Tabla 11**). Estos resultados confirman la susceptibilidad del IBB1 en su estado inactivo a la acción de la pepsina, resultando en la liberación de un número elevado de fragmentos derivados de este isoinhibidor.

Tabla 11. Péptidos identificados en los digeridos obtenidos de las mezclas de lunasina:IBB1 después de la fase gástrica e intestinal de la simulación de la digestión gastrointestinal. Los picos (números o letras) corresponden a los picos de los péptidos de las secuencias que se muestran en las **Figuras 24, 25 y 26** (Los números corresponden a péptidos derivados de lunasina y las letras a péptidos derivados de IBB1)

Pico	Fragmento de proteína	Secuencias de péptidos	Ión m/z (carga)	Simulación de los digeridos gástricos				Simulación de los digeridos gastrointestinales			
				1:0	1:1	1:2	1:2i	1:0	1:1	1:2	1:2i
1	f(29-35)	KIQGRGD	773.5(+1)	+	+	+	-	-	-	-	-
2	f(29-36)	KIQGRGDD	888.5(+1)	+	+	+	+	-	-	+	-
3	f(29-37)	KIQGRGDDD	1003.6(+1)	+	+	-	+	-	-	+	-
4	f(29-38)	KIQGRGDDDD	1118.6(+1)	+	+	-	+	-	-	-	-
5	f(29-39)	KIQGRGDDDDD	1233.7(+1)	+	+	+	+	-	-	+	-
6	f(28-33)	EKIQGR	729.7(+1)	+	+	+	+	+	+	+	+
7	f(29-41)	KIQGRGDDDDDD	1463.7(+1)	+	+	+	-	-	+	+	-
8	f(29-40)	KIQGRGDDDDDD	1348.6(+1)	-	-	+	+	-	+	+	+
9	f(29-43)	KIQGRGDDDDDDDD	1694.0(+1)	+	+	+	+	+	+	+	+
10	f(11-18)	RKQLQGVN	942.7(+1)	+	+	+	+	-	+	+	+
11	f(24-28)	KHIME	657.5(+1)	+	+	+	-	+	+	+	-
12	f(1-8)	SKWQHQQD	1056.6(+1)	+	+	+	-	-	+	+	-
13	f(1-10)	SKWQHQQDSC	1246.7(+1)	+	+	+	+	-	+	+	+
14	f(19-23)	LTPCE	562.3(+1)	+	-	-	-	-	-	-	-
15	f(21-28)	PCEKHIME	986.6(+1)	+	-	-	-	-	-	-	-
16	f(20-28)	TPCEKHIME	1087.6(+1)	+	-	-	-	-	-	-	-
17	f(1-18)	SKWQHQQDSCRKQLQGVN	1085.8(+2)	+	+	+	+	-	+	+	-
18	f(19-28)	LTPCEKHIME	1200.8(+1)	+	+	+	+	-	+	+	+
19	f(11-19)	RKQLQGVNL	1055.8(+1)	+	+	+	+	-	+	+	+
20	LUNASINA: SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPCEKHIMEKIQGRGDDDDDDDD		1677.2(+3) 1258.0(+4)	+	+	+	+	+	+	+	+
21	f(17-28)	VNLTPCEKHIME	1413.9(+1)	+	-	-	-	-	-	-	-
22	f(11-28)	RKQLQGVNLTPCEKHIME	1062.8(+2)	+	-	-	+	-	-	-	+
23	f(11-20)	RKQLQGVNLT	1156.7(+1)	-	+	+	-	-	+	+	-
24	f(28-37)	EKIQGRGDDD	1133.4(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
25	f(4-10)	QHQQDSC	845.5(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
26	f(34-43)	GDDDDDDDD	1111.4(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
27	f(29-33)	KIQGR	601.5(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
28	f(4-11)	QHQQDSCR	1001.6(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
29	f(28-32)	EKIQG	573.4(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
30	f(28-34)	EKIQGRG	786.6(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
31	f(19-24)	LTPCEK	690.5(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-

32	f(25-28)	HIME	529.4(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
33	f(29-34)	KIQGRG	658.5(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
34	f(27-38)	MEKIQGRGDDDD	1378.7(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
35	f(1-3)	SKW	420.4(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
36	f(17-24)	VNLTPCEK	903.7(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
37	f(16-24)	GVNLTPCEK	960.6(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
38	f(15-24)	QGVNLTPCEK	1088.7(+1)	-	-	-	-	+	-	-	-
39	f(28-43)	EKIQGRGDDDDDDDD	911.9(+2)	-	-	-	-	-	+	-	-
40	f(31-43)	QGRGDDDDDDDDDD	1451.5(+1)	-	-	-	-	-	-	+	-
A	f(19-26)	PPQCRCS	1019.5(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
B	f(14-26)	CTKSNPPQCRCS	1609.8(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
C	f(1-13)	DDESSKPCCDQCA	1571.7(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
D	f(1-15)	DDESSKPCCDQCACT	1832.8(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
E	f(16-27)	KSNPPQCRCS	1479.7(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
F	f(24-35)	CSDMRLNSCHSA	719.3(+2)	-	-	-	+	-	-	-	-
G	f(30-42)	NSCHSACKSCICA	1554.7(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
H	f(58-71)	CYEPCKPSEDDKEN	885.9(+2)	-	-	-	+	-	-	-	-
I	f(58-66)	CYEPCKPSE	1169.6(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
J	f(51-56)	CVDITD	722.4(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
K	f(46-50)	PAQCF	622.4(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
L	f(43-49)	LSYPAQC	838.4(+1)	-	-	-	+	-	-	-	-
M	f(57-71)	FCYEPCKPSEDDKEN	959.5(+2)	-	-	-	+	-	-	-	+
N	f(61-71)	PCKPSEDDKEN	1318.7(+1)	-	-	-	+	-	-	-	-
O	f(27-29)	MRL	419.3(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
P	f(57-67)	FCYEPCKPSED	1431.7(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
Q	f(57-66)	FCYEPCKPSE	1316.7(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
R	f(43-50)	LSYPAQCF	985.5(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
S	f(51-57)	CVDITDF	869.4(+1)	-	-	-	+	-	-	-	+
T	IBB1: DDESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSMDRLNSCHSACKSCIAL SYPAQCFCVDITDFCYEPCKPSEDDKEN		1572.8(+5) 1310.7(+6)	-	+	+	+	-	+	+	-
U	f(2-7)	DESSKP	661.3(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
V	f(16-22)	KSNPPQC	830.5(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
W	f(17-23)	SNPPQCR	858.4(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
X	f(16-23)	KSNPPQCR	986.6(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
Y	f(17-26)	SNPPQCRCS	1220.6(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
Z	f(31-42)	SCHSACKSCICA	1440.7(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
α	f(28-42)	RLNSCHSACKSCICA	912.5(+2)	-	-	-	-	-	-	-	+
β	f(46-49)	PAQC	475.2(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+
γ	f(54-57)	ITDF	495.2(+1)	-	-	-	-	-	-	-	+

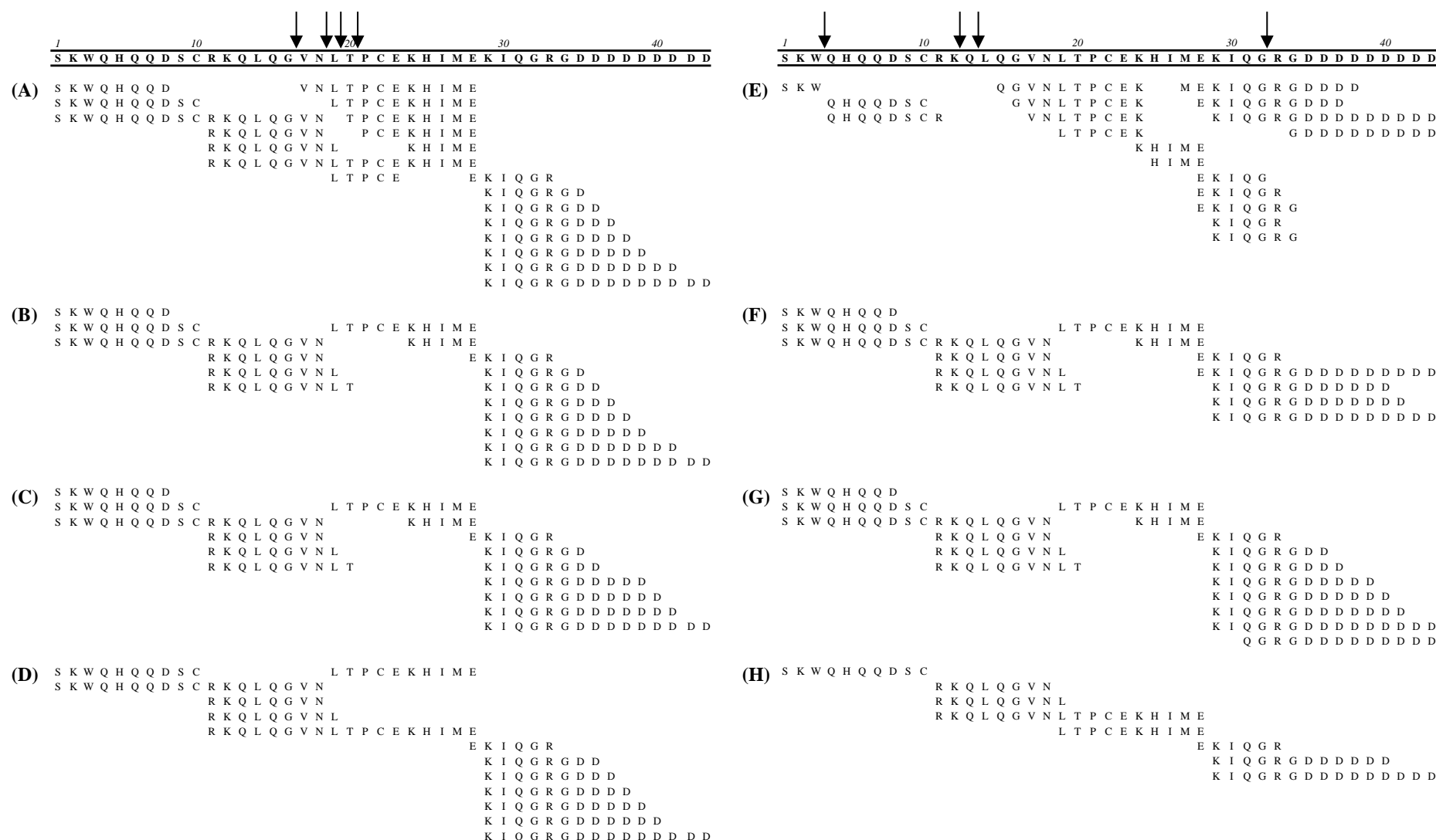


Figura 25. Péptidos derivados de lunasina identificados en los digeridos (A-D) fase gástrica y (E-H) fase intestinal de la simulación de la digestión gastrointestinal de lunasina:IBB1 en proporciones (p:p) (A y E) 1:0, (B y F) 1:1, (C y G) 1:2 y (D y H) 1:2 con IBB1 inactivo. Los enlaces peptídicos susceptibles a hidrólisis en ausencia de IBB1 pero resistente en presencia de este isoinhibidor se indican con una flecha.

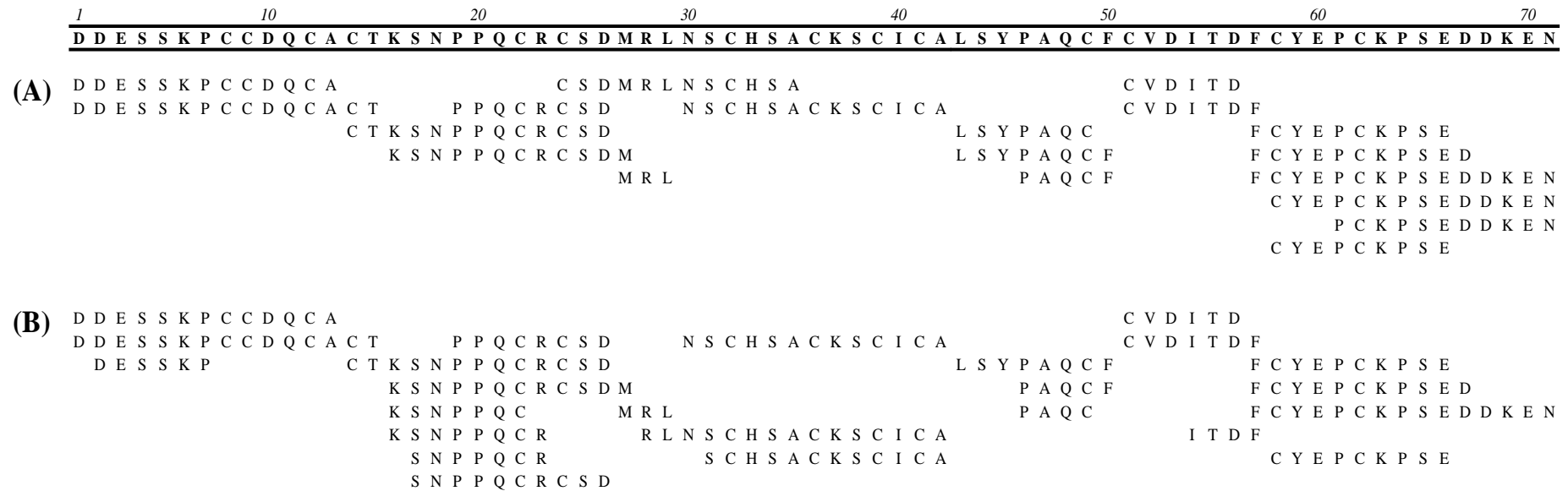


Figura 26. Péptidos derivados de IBB1 identificados en los digeridos (A) fase gástrica y (B) fase intestinal de la simulación de la digestión gastrointestinal de lunasina:IBB1 inactivo en proporción 1:2 (p:p).

La lunasina residual que había quedado en las mezclas preparadas en ausencia del IBB1 después de la fase de digestión gástrica fue degradada completamente por la acción de las proteasas pancreáticas (**Tabla 12** y **Figura 28A**). La completa degradación de la lunasina por acción de las enzimas pancreáticas había sido previamente observado por Hernández-Ledesma y col. (2009) al digerir muestras de leche de soja que no contenía BBI con pancreatina durante 60 min. Sin embargo, el IBB1 en su estado activo ejerció un papel protector sobre la lunasina frente a la hidrólisis por estas enzimas, lo que podría explicarse por su actividad inhibidora de la tripsina y la quimotripsina. Otros autores habían sugerido la función protectora del BBI (de Mejía y col., 2010), los cuales determinaron, mediante métodos inmunológicos, que la cantidad de lunasina residual tras la digestión secuencial con pepsina y pancreatina de muestras de soja enriquecida con este péptido fue del 3% de la lunasina original. En nuestro estudio, el efecto inhibidor sobre la acción de la tripsina y la quimitripsina dependió de la dosis, siendo mayor cuando el IBB1 estuvo presente a la concentración más elevada (lunasina:IBB1 en proporción 1:2, p/p). En este caso, el porcentaje de lunasina residual al final de todo el proceso digestivo fue del 5,3%. De manera que tras la ingesta de 0,94 g de lunasina contenidos en 25 g de proteína de soja (recomendado por la FDA para prevenir enfermedades cardiovasculares), el 5% resistiría la digestión gastrointestinal, resultando en 47 mg de lunasina biológicamente activa con capacidad de actuar tanto a nivel local como sistémico, tras su absorción.

La cantidad de lunasina residual en presencia de IBB1 activo (proporción 1:1) y de IBB1 inactivo (proporción 1:2) fue similar del 1,8% y 1.5%, respectivamente (**Tabla 10**). Como se ha mencionado anteriormente, el IBB1 inactivo no mostró actividad inhibidora sobre la acción de la tripsina y la quimotripsina. Sin embargo, esta isoforma en su estado inactivo protegió ligeramente a la lunasina de la acción de estas enzimas pancreáticas. Este resultado sugiere que, adicionalmente a su conocido mecanismo inhibidor de enzimas, la

mera presencia del isoinhibidor podría ser suficiente para envolver a la lunasina y protegerla de la acción proteolítica de la tripsina y la quimotripsina. Además, al igual que se ha comentado para la digestión gástrica, algunos de los péptidos derivados del IBB1 inactivo podrían contribuir en la protección frente a la digestión duodenal.

Como se ha indicado anteriormente, en las muestras de los digeridos gástricos de las mezclas en ausencia de IBB1, se identificaron 20 péptidos derivados de lunasina. Sólo tres de ellos, correspondientes a las secuencias ²⁴KHIME²⁸, ²⁸EKIQGR³³, y ²⁹KIQGRGDDDDDDDD⁴³, se encontraron también al final del proceso digestivo, lo que indicó que estos fragmentos no fueron susceptibles de la acción de la tripsina y la quimotripsina (**Figura 25E**). El resto de los péptidos no se identificaron en el digerido intestinal, lo que indica que, en ausencia del isoinhibidor, las enzimas pancreáticas actuaron sobre las secuencias de los péptidos formados durante la fase gástrica, liberando fragmentos de menor tamaño y/o aminoácidos libres. Se identificaron 15 nuevos péptidos derivados de la lunasina en los digeridos obtenidos al final de la simulación de la digestión gastrointestinal en ausencia de IBB1 (**Figura 25E-H y Tabla 11**). La formación de ocho de estos péptidos, que corresponden a los fragmentos ⁴QHQQDSCR¹¹, ¹⁵QGVNLTPCEK²⁴, ¹⁶GVNLTPCEK²⁴, ¹⁷VNLTPCEK²⁴, ¹⁹LTPCEK²⁴, ²⁵HIME²⁸, ²⁹KIQGR³³, y ³⁴GDDDDDDDD⁴³, podría explicarse por la acción de la tripsina en enlaces peptídicos susceptibles. El resto de ellos probablemente se formaron por la acción combinada de la tripsina y la quimotripsina utilizadas durante la fase intestinal. Ninguno de los 15 péptidos identificados en los digeridos sin IBB1 se encontraron en los digeridos que contenían IBB1 activo, lo que sugiere la capacidad de este isoinhibidor para proteger, frente a la acción de la tripsina y la quimotripsina, tanto a la lunasina como a los fragmentos derivados de este péptido durante la fase gástrica. Sin embargo, también resultó interesante la ausencia de estos 15 péptidos en los digeridos que contenían IBB1 inactivo.

Estos resultados confirman que la presencia de IBB1, tanto en su forma activa como inactiva es suficiente para proteger a la lunasina y sus fragmentos derivados frente a la digestión por acción de las enzimas duodenales.

Al igual que se había observado tras la fase gástrica, no se liberó ningún péptido a partir del IBB1 activo durante la fase duodenal. Esto se debió a la actividad inhibidora de las enzimas pancreáticas ejercida por el IBB1 junto con su estructura molecular con siete puentes disulfuro que evitaron su autólisis, y por lo tanto, la liberación de fragmentos a partir de este isoinhibidor (**Figura 27B y C**). Sin embargo, se llevó a cabo la identificación de péptidos derivados del IBB1 en su estado inactivo. De los 19 péptidos que se identificaron en los digeridos gástricos de mezclas que contenían esta isoforma en su estado inactivo, cuatro, correspondientes a la secuencias ²⁴CSDMRLNSCHSA³⁵, ⁴³LSYPAQC⁴⁹, ⁵⁸CYEPCKPSEDDKEN⁷¹ y ⁶¹PCKPSEDDKEN⁷¹ no se detectaron al final de la digestión intestinal, lo que indica su susceptibilidad a la acción de la tripsina y la quimotripsina. El resto de los péptidos se encontraron al final de la digestión intestinal mostrando cierta resistencia a la acción de las enzimas pancreáticas (**Figura 26**). La presencia del dominio inhibidor de tripsina de IBB1 localizado entre los aminoácidos ¹⁴T y ²²K (Clemente y col., 2010) podría proteger a la lunasina y sus fragmentos derivados durante la digestión adicional por la tripsina.

2.3.4. Efecto de los digeridos sobre la viabilidad de células de cáncer de colon

Los digeridos obtenidos al final del proceso de digestión simulada se ensayaron en dos líneas de adenocarcinoma de colon, HT-29 y Caco-2, para determinar su posible efecto sobre la viabilidad celular. Ésta se determinó mediante el ensayo del MTT. Con el fin de evaluar la dosis-respuesta, los digeridos se probaron a la concentración inicial de proteína

(0,3 mg/ml) y una vez diluidos, 1,5 y 3 veces, en el medio de crecimiento celular. Los medios de digestión en ausencia de lunasina y de IBB1 también se ensayaron para evaluar si las sustancias utilizadas para simular la digestión eran capaces de disminuir la viabilidad celular (**Figura 28**). Cuando se añadieron estos medios sin diluir a las células Caco-2 y HT-29, los porcentajes de células viables fueron del $70,5 \pm 8,0\%$ y $86,6 \pm 4,0\%$, respectivamente, indicando que los compuestos empleados para llevar a cabo la digestión podrían tener un efecto inhibitor de la viabilidad celular. Sin embargo, este efecto fue significativamente mayor cuando se probaron los digeridos de las mezclas de lunasina en presencia y/o ausencia de IBB1. En el caso del efecto sobre las células HT-29, el efecto inhibitor de la viabilidad celular fue dosis dependiente (**Figura 28A**). El digerido obtenido a partir de la muestra sin IBB1 disminuyó la viabilidad de las células un 52,4% a la concentración más alta de proteína ensayada (0,3 mg/ml). El valor de IC_{50} calculado para este digerido fue de 0,29 mg/ml. Como la cantidad de lunasina detectada en este hidrolizado fue muy baja (0,1%), la actividad inhibitoria de la viabilidad celular se atribuye principalmente a la presencia de los péptidos formados durante la digestión de la lunasina. Sin embargo, estos péptidos no ejercieron ningún efecto sobre las células Caco-2 (**Figura 28B**), lo que indica que la actividad fue dependiente del tipo de línea celular estudiada.

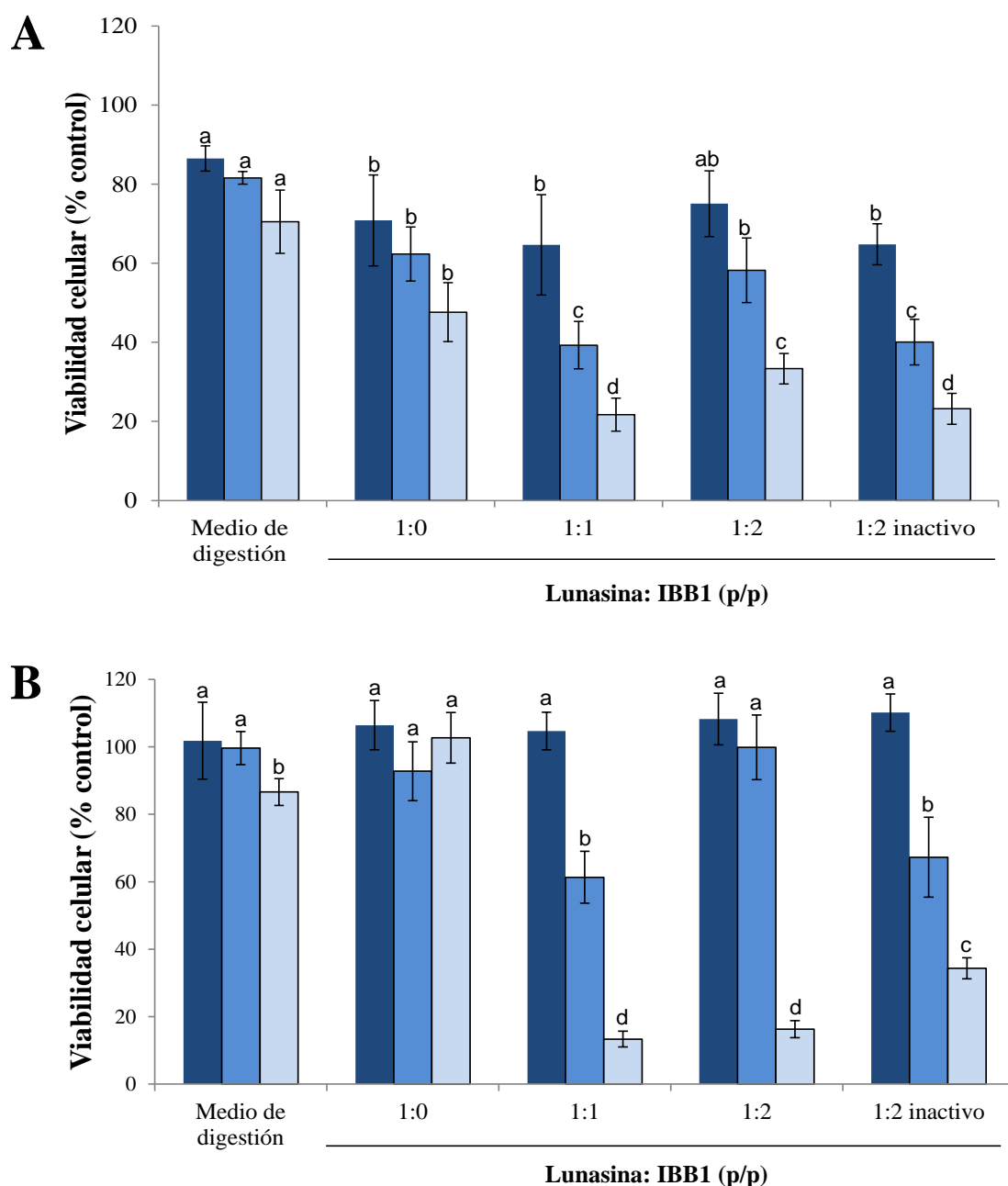


Figura 28. Efecto sobre la proliferación de células de adenocarcinoma de colon humano (A) HT-29 y (B) Caco-2. Se muestran los digeridos obtenidos al final de la simulación de la digestión gastrointestinal del medio de digestión en ausencia de lunasina y IBB1, y de mezclas de lunasina: IBB1 en diferentes proporciones y concentración de proteína (■) 0,1 mg/ml, (▒) 0,2 mg/ml, y (□) 0,3 mg/ml. La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo MTT. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como porcentaje de células viables en comparación con las células control no tratadas, consideradas como 100%. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre digeridos la misma concentración de proteína y la dilución correspondiente del medio de digestión sin péptidos.

En el caso de los digeridos obtenidos a partir de las mezclas lunasina:IBB1, se observaron efectos inhibitorios de la viabilidad celular en ambas líneas celulares. Estos resultados indican que tanto los polipéptidos lunasina e IBB1 como los fragmentos derivados de su digestión ejercieron cierto efecto inhibitorio de la viabilidad de células cancerígenas. Los valores calculados de IC_{50} fueron de 0,16 mg/ml y 0,23 mg/ml para las células HT-29 y Caco-2, respectivamente, lo que indica que las primeras fueron más sensibles a la acción de los péptidos que las células Caco-2.

Estudios previos habían descrito la actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer de colon tanto de la lunasina como del BBI. En el caso de la lunasina, Día y de Mejía (2010, 2011b) describieron la actividad citotóxica de lunasina procedente de soja en las líneas celulares de cáncer de colon HT29, KM12L4, RKO y HCT-116. Para el IBB1, el estudio de Clemente y col. (2010) determinó su efecto inhibitorio de la viabilidad de células HT-29, con un valor de IC_{50} de 39,9 μ M. Además, recientemente, un hidrolizado enriquecido con proteínas de soja obtenido tras la simulación de la digestión gastrointestinal fue fraccionado evaluándose su efecto sobre la proliferación de las células de cáncer de colon HCT-116 y Caco-2 (Rayaprolu y col., 2013). Las fracciones que demostraron un mayor efecto antiproliferativo fueron las que tenían peso molecular pequeño (<5 kDa) y las que contenían polipéptidos (10-50 kDa), aunque las secuencias de los péptidos responsables no fueron determinadas. Por lo tanto, hasta el presente estudio no existían datos sobre la actividad inhibitoria de la viabilidad celular de digeridos de lunasina y/o IBB1 obtenidos tras la acción de enzimas digestivas en un proceso simulando las condiciones fisiológicas. En nuestro estudio, al final del proceso de la simulación de la digestión gastrointestinal se identificaron 29 fragmentos derivados de lunasina y 24 fragmentos derivados del IBB1, aunque su presencia dependió de la composición de la mezcla digerida. Los digeridos presentaron potentes propiedades inhibitorias de la

viabilidad de células de cáncer de colon Caco-2 y HT-29, lo que indica que tanto lunasina, IBB1 como los fragmentos derivados de ellos tras la acción de la pepsina, tripsina y quimotripsina podrían ser responsables de los efectos observados. Hasta ahora, sólo un fragmento derivado de la lunasina, el f(23-43), cuya secuencia es ²³EKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD⁴³, había demostrado mayor actividad anti-proliferativa en las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 que la lunasina completa (Hernández-Ledesma y col., 2010).

Por lo tanto, nuestro estudio es el primero que indica que los péptidos formados durante la digestión gastrointestinal de lunasina e IBB1 poseen efectos inhibidores de la viabilidad de células de cáncer de colon. Sin embargo, serían necesarios más estudios evaluando la actividad de cada uno de estos péptidos de manera individualizada para confirmar sus efectos y determinar la secuencia responsable de los mismos.

CONCLUSIONES

1. La hidrólisis con tripsina de un subproducto industrial de caseína da lugar a la formación de caseinofosfopéptidos (CPPs). Dado que mediante simulación gastrointestinal del subproducto de caseína se obtienen secuencias homólogas a las obtenidas con tripsina, se concluye que este subproducto puede ser empleado como fuente de CPPs para favorecer la absorción de minerales a nivel intestinal sin necesidad de hidrólisis previa.
2. La hidrólisis de proteínas de suero lácteo con Alcalasa[®], pancreatina o Flavourzyme[®], permite obtener péptidos con afinidad al hierro. Dichos péptidos pertenecen a las regiones de β -Lg ⁴²YVEELKPTPEGDLEILLQ⁵⁹ y ¹²⁵TPEVDDEALEKFD¹³⁷. La capacidad de unión del hierro de los péptidos se atribuyó principalmente a la presencia de ácido aspártico y glutámico.
3. Dos péptidos derivados de α_{s1} -caseína ¹⁴³AYFYPEL¹⁴⁹ e ¹⁴⁴YFYPEL¹⁴⁹ y el hidrolizado de caseína con pepsina que los contiene, promueven la expresión de gen MUC5AC y la secreción de mucinas en células HT29-MTX.
4. El hidrolizado de caseínas con actividad estimulante sobre la producción de mucinas y la caseína de partida sin hidrolizar presentan actividad antiulcerogénica en un modelo de úlceras inducidas por etanol en ratas. Asimismo, un hidrolizado trípico de un concentrado de suero enriquecido en β -lactoglobulina también ejerce un efecto protector sobre la mucosa gástrica.

5. El isoinhibidor-1 de Bowman-Birk aumenta la resistencia de la lunasina a la hidrólisis enzimática en condiciones que simulan el tracto gastrointestinal. Los digeridos obtenidos al final de la digestión gastrointestinal simulada disminuyen la viabilidad celular en cultivos de HT-29 y Caco-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, N.J., Reynolds, E.C. (1995a). Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 45:196-204.
- Adamson N.J., Reynolds, E.C. (1995b). Characterization of multiply phosphorylated peptides selectively precipitated from a pancreatic casein digest. *Journal of Dairy Science*. 78:2553-2559.
- Adamson N.J., Reynolds, E.C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 202-207.
- Adamson N.J., Reynolds, E.C. (1997). Relationship between degree of casein hydrolysis and phosphopeptide release. *Journal of Dairy Research* 64:505-514.
- Adt, I., Dupas, C., Boutrou, R., Oulahal, N., Noel, C., Mollé, D., Juvet, T., Degraeve, P. (2011). Identification of caseinophosphopeptides generated through *in vitro* gastro-intestinal digestion of Beaufort cheese. *International Dairy Journal* 21: 129-134.
- Aimutis, W.R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *Journal of Nutrition* 134:989S-995S.
- Aït-Oukhatar, N., Bouhallab, S., Arhan, P., Maubois, J.L., Drosowsky, M., Bougle, D. (1999). Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of beta-casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2786-2790.
- Ait-Oukhatar, N., Peres, J.M., Bouhallab, S., Neuville, D., Bureau, F., Bouvard, G., Arhan, P., Bougle, D. (2002). Bioavailability of caseinophosphopeptide-bound iron. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 140: 290-294.
- Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm, H., Jacobsen, M., Langsrud, T., Vegarud, G.E. (2011). Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *British Journal of Nutrition* 106: 896-905.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 25: 2097-116.
- Ani-Kibangou, B., Bouhallab, S., Molle, D., Henry, G., Bureau, F., Neuville, D., Arhan, P., Bougle, D. (2005). Improved absorption of caseinophosphopeptide-bound iron: role of alkaline phosphatase. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 398-401.

- Aoki, T., Nakano, T., Iwashita, T., Sugimoto, Y., Ibrahim, H.R., Toba, Y., Aoe, S., Nakajima, I. (1998). Preparation and characterization of micellar calcium phosphate-casein phosphopeptide complex. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 44: 447-456.
- Ardö, Y., Lilbaek, H., Kristiansen, K.R., Zakora, M., Otte, J. (2007). Identification of large phosphopeptides from β -casein that characteristically accumulate during ripening of the semi-hard cheese Herrgård. *International Dairy Journal* 17: 513-524.
- Argyri, K., Miller, D.D., Glahn, R.P., Zhu, L., Kapsokefalou, M. (2007). Peptides isolated from *in vitro* digests of milk enhance iron uptake by Caco-2 cells. *Journal Agriculture Food Chemistry* 55: 10221-10225.
- Argyri, K., Theophanidi, E., Kapna, A., Staikidou, C., Pounis, G., Komaitis, M., Georgiou, C., Kapsokefalou, M. (2011). Iron or zinc dialyzability obtained from a modified *in vitro* digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. *Food Chemistry* 127: 716-721.
- Arques, M.C., Marín-Manzano, M.C., Clarissa-Brito, L., Hernandez-Ledesma, B., Recio I., Clemente A. (2014). Quantitative determination of active Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, in comercial soymilks. *Food Chemistry* 155: 24-30.
- Arunachalam, K., Raja, R.B. (2010). Isolation and characterization of CPP (caseinphosphopeptides) from fermented milk. *African Journal of Food Science* 4: 167-175.
- Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273.
- Azarpazhooh, A., Limeback, H. (2008). Clinical efficacy of casein derivatives. *Journal of American Dental Association* 139: 915-924.
- B**abu, S.D., Jayanthi, V., Devaraj, N., Reis, C.A., Devaraj, H. (2006). Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in *Helicobacter pylori* infected pre neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Molecular Cancer* 5: 5-10.
- Barbé, F., Le Feunteun, S., Remond, D., Menard, O., Jardin, J., Henry, G., Laroche, B., Dupont, D. (2014). Tracking the *in vivo* release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Research International* 63: 147-156.

- Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J-A., Cuber, J.C., Plaisancié, P. (2000). Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46: 218-224.
- Baum, F., Ebner, J., Pischetsrieder, M. (2013). Identification of multiphosphorylated peptides in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 9110-9117.
- Baynes, J.W., y Dominiczak, M.H. (2011). *Bioquímica Médica*. 3ª edición. Elsevier, España., pp. 5-7.
- Bermeosolo-Bidasolo, I., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J.A. (2011). *In vitro* simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal* 24: 146-152.
- Berrocal, R., Chanton, S., Juillerat, M.A., Favillare, B., Scherz, J-C., Jost, R. (1989). Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *Journal of Dairy Research* 56: 335-341.
- Bhutia, S.K., Maiti, T.K. (2008). Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trend in Biotechnology* 26: 210-217.
- Blass, E., FitzGerald, E. (1988). Milk-induce analgesia and comforting in 10-day-old rats: Opioid mediation. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 29: 9-13.
- Borges, P.F.Z., Sgarbieri, V.C., Dias, N.G.P., Jacobucci, H.B., Pacheco, M.T.B., Baldini, V.L.S. (2001). Produção piloto de proteínas de leite bovino: Composição e valor nutritivo. *Brazilian Journal of Food Technology* 52: 1-8.
- Bouhallab, S., Ait-Oukhatar, N.A., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.L., Arhan, P., Bouglé, D.L. (1999). Sensitivity of beta-casein phosphopeptide-iron complex to digestive enzymes in ligated segment of rat duodenum. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10: 723-727.
- Bouhallab, S., Bouglé, D. (2004). Biopeptides of milk: Caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reproduction Nutrition Development* 44: 493-498.
- Bouhallab, S., Cinga, V., Ait-Oukhatar, N., Bureau, F., Neuville, D., Arhan, P., Maubois, J.L., Bouglé, D. (2002). Influence of various phosphopeptides of caseins on iron absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7127-7130.
- Boutrou, R., Coirre, E., Jardin, J., Léonil, J. (2010). Phosphorylation and coordination bond of mineral inhibit the hydrolysis of the β -casein (1-25) peptide by intestinal brush-border membrane enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7955-7961.

- Boutrou, R., Gaudichon, C., Dupont, D., Jardin, J., Airinei, G., Marsset-Baglieri, A., Benamouzig, R., Tomé, D., Leoni, J. (2013). Sequential release of milk protein derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 97: 1314-1323.
- Bouzerzour, K., Morgan, F., Cuinet, I., Bonhomme, C., Jardin, J., Le, Huërou-Luron, I., Dupont, D. (2012). *In vivo* digestion of infant formula in piglets: Protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *British Journal of Nutrition* 108: 2105-2114.
- Brandon, D.L., Friedman, M. (2002). Immunoassays of soy proteins. *Journal Agriculture of Food Chemistry* 50: 6635-6642.
- Brantl, V. (1984). Novel opioid peptides derived from human casein: human β -casomorphins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 106: 213-214.
- Brantl, V., Teschemacher, A., Henschen, A., Lottspeich, F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). *Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische* 360: 1211-1216.
- Brommage, R., Juillerat, M.A., Jost, R. (1991). Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal calcium-absorption in adult female rats. *Lait* 71: 173-180.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P. J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J. B., van Seuningen, I., y Renes, I. B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: Implications for epithelial protection. *Biochemical Journal* 420: 211-219.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D. (2008). Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science* 91: 29-38.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal* 17: 968-975.
- Butler, J.E. (1974). Immunoglobulins of the mammary secretions. In: *Lactation: a comprehensive treatise*, Larson, B.L. and Smith, V.R. (Eds.). Academic Press, New York. pp. 217-256.
- Caroli, A.M., Cheesa, S., Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science* 92: 5335-5352.

- Castro, G.A., Carvalho, J.E., Tinti, S.V., Possenti, A., Sgarbieri, V.C. (2010). Antiulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. *Journal of Medicinal Food* 13: 83-90.
- Cavazos, A., Morales, E., Dia, V.P., De Mejia, E.G. (2012). Analysis of lunasin in commercial and pilot plant produced soybean products and an improved method of lunasin purification. *Journal of Food Science* 77: 539-545.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jolles, P., Fiat, A.M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80: 155-165.
- Chang, H.C., Lewis, D., Tung, C.Y., Han, L., Henriquez, S.M.P., Voiles, L., Lupov, I.P., Pelloso, D., Sinn, N.L., Pollok, K.L., de Lumen B.O., Li, F., Blum, J.S., Srivastava, S., Robertson, M.J. (2014). Soy peptide lunasin in cytokine immunotherapy for lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63: 283-295.
- Chang, K.J., Su, Y.F., Brent, D.A., Chang, J.K.V. (1985). Isolation of a specific mu-opiate receptor peptide, morphiceptin, from an enzymatic digest of milk proteins. *Journal of Biology Chemistry* 260: 9706-9712.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P. y Brodtkorb A. (2006). Bioactivity of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin: Technological implications for processing. *International Dairy Journal* 16: 1229-1240.
- Chaud, M.V., Izumi, C., Nahaal, Z., Shuhama, T., Bianchi, M.D.P., de Freitas, O. (2002). Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 871-877.
- Chen, D., Liu, Z., Huang, W., Zhao, Y., Dong, S., Zeng, M. (2013). Purification and characterisation of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods* 5: 689-697.
- Chiba, H., Tani, F., Yoshikawa, M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from k-casein. *Journal of Dairy Research* 56: 363-366.
- Choi, I., Jung, C., Choi, H., Kim, C., Ha, H. (2005). Effectiveness of phosphatidyl peptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *Food Chemistry* 93: 577-583.

- Claustre, J., Toumi, F., Trompette, A., Jourdan, G., Guignard, H., Chayvialle, J.A., Plaisancié, P. (2002). Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 283: 1-8.
- Clemente, A., Arques, M.C. (2014). Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World Journal of Gastroenterology* 20: 10305-10315.
- Clemente, A., Jiménez, E., Marín-Manzano, M.C., Rubio, L.A. (2008). Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 513-521.
- Clemente, A., MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Domoney, C. (2004). The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Protein Expression and Purification* 36: 106-114.
- Clemente, A., Moreno, F.J., Marín-Manzano, M.C., Jiménez, E., Domoney, C. (2010). The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular Nutrition & Food Research* 5: 396-405.
- Contreras, M.M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M., Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* 19: 566-573.
- Contreras, M. d. M., Sevilla, M. A., Monroy-Ruiz, J., Amigo, L., Gómez-Sala, B., Molina, E., Ramos, M., Recio, I. (2011). Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *International Dairy Journal* 21: 470-476.
- Corfield, A.P., Myerscough, N., Longman, R., Sylvester, P., Arul, S., Pignatelli, M. (2000). Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut* 47: 589-594.
- Corsetti, A., Massitti, O., Minervini, F., Fox, P.F., Gobbetti, M. (2003). Production of caseinophosphopeptides from Na-caseinates prepared from the milk of several species by a proteinase of *Lactobacillus helveticus* PR4. *Food Biotechnology* 17: 183-192.
- Cross, K.J., Huq, N.L., O'Brien-Simpson, N.M., Perich, J.W., Attard, T.J., Reynolds, E.C. (2007). The role of multiphosphorylated peptides in mineralized tissue regeneration. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 13: 479-495.

- Cuccurullo, M., Schlosser, G., Cacace, G., Malorni, L., Pocsfalvi, G. (2007). Identification of phosphoproteins and determination of phosphorylation sites by zirconium dioxide enrichment and SELDI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 42: 1069-1078.
- Dallas, D.C., Guerrero, A., Khaldi, N., Castillo, P. A., Martin, W.F., Smilowitz, J.T., Bevins, C.L., Barile, D., German, J.B., Lebrilla, C.B. (2013). Extensive *in vivo* human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. *Journal of Proteome Research* 12: 2295-2304.
- Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. In: *Food Proteins and their Applications*, Damodaran, S. and Paraf, A. (Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-24.
- Daniel, H., Vohwinkel, M., Rehner, E. (1990). Effect of casein and beta-casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *Journal of Nutrition* 120: 252-257.
- De Jesus, N.Z.T., Falcão, H.D.S., Gomes, I.F., Leite, T.J.D.A., Lima, G.R.D.M., Barbosa-Filho, J.M., Tavares, J.F., da Silva, M.S., de Athayde-Filho, P.F., Batista, L.M. (2012). Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3203-3228.
- De Kok, T.H., Van Breda, S.G., Manson M.M. (2008). Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European Journal of Nutrition* 47: 51-59.
- De la Hoz, L., Nunes da Silva, V.S., Morgano, M.A., Pacheco, B.M.T. (2014a). Small peptides from enzymatic whey hydrolysates increase dialyzable iron. *International Dairy Journal* 38: 145-147.
- De la Hoz, L., Ponezi A.N., Milani R.F., Nunes da Silva, V.S., Sonia de Souza A., Bertoldo-Pacheco M.T. (2014b). Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. *Food Chemistry* 142: 166-169.
- De Lumen, B.O. (2005). Lunasin: A cancer-preventive soy peptide. *Nutrition Reviews* 63: 16-21.
- De Mejia, E.G., Dia, V.P. (2010). The role of nutraceuticals proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer and Metastasis Reviews* 29: 511-28.
- De Mejia, E.G., Vasconez, M., de Lumen, B.O., Nelson, R. (2004). Lunasin concentration indifferent soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 5882-5887.

- De Mejia, E.G., Wang, W., Dia, V. P. (2010). Lunasin, with an arginine-glycine-aspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 406-414.
- De Noni, I., Cattaneo, S. (2010). Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry* 119: 560-566.
- Dia, V.P., de Mejia, E.G. (2010). Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer Letters* 295: 44-53.
- Dia, V.P., de Mejia, E.G. (2011a). Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition Food Research* 55: 623-34.
- Dia, V.P., de Mejia, E.G. (2011b). Lunasin potentiates the effect of oxaliplatin preventing outgrowth of colon cancer metastasis, bind to $\alpha_5\beta_1$ integrin and suppresses FAK/ERK/NF-kB signaling. *Cancer Letters* 313: 167-80.
- Dia, V.P., de Mejia, E.G. (2013). Potential of lunasin-orally administered in comparison to intraperitoneal injection to inhibit colon cancer metastasis *in vivo*. *Journal of cancer Therapy* 4: 34-43.
- Dia, V.P., Frankland-Searbyb, S., del Hierro, F.L., Garcia, G., de Mejía, E.G. (2013). Structural property of soybean lunasin and development of a method to quantify lunasin in plasma using an optimized immunoassay protocol. *Food Chemistry* 138: 334-341.
- Dia, V.P., Torres, S., De Lumen B.O., John, W., Erdman, J., Gonzalez de Mejia, E.G. (2009). Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption. *Journal Agriculture of Food Chemistry* 57: 1260-1266.
- Dia, V.P., Wang, W., Oh, V.L., de Lumen, B.O., de Mejia, E. G. (2009). Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry* 114: 108-115.
- Dial, E.J., Lichtenberger, L.M. (1987). Milk protection against experimental ulcerogenesis in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 32:1145-1150.

- Diaz, M., Dunn, C.M., McClements, D.J., Decker, E.A. (2003). Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural Food Science* 52: 2365-2370.
- Domoney, C., Welham, T (1992). Trysin inhibitors in *Pisu*: Variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Science Research* 2: 147-154.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Léonil, J., Faulks, R.M. (2010a). Comparative resistance of food proteins to adult and infant *in vitro* digestion models. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54: 767-780.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Role-Répécaud, O., Duboz, G., Leonil, L., Clare, E., Mills, N., Mackie, R.A. (2010b). Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 1677-1689.
- Eckert, E., Bamdad, F., Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chemistry* 159: 498-506.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrel, H.M. Jr., Harwalkar, V.R., Jenness, R. Whitney, R.McL. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67: 1599-1631.
- Eisenstadt, A., Schafer, U., Glei, M., Jahreis G. (2013). Iron metabolism and prevention of iron deficiency via iron fortification of foods. *Journal Trace Elements Electrolytes* 30:156-166.
- Ellegard K.H., Gammelgard-Larsen, C., Sorensen, E.S., Fedosov, S. (1999). Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal* 9: 639-652.
- Eriksen, E.K., Holm, H., Jensen, E., Aaboe, R., Devold, T.G., Jacobsen, M., Vegarud, G.E. (2010). Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition* 104: 374-381.
- Erickson, R.H., Song, I.S., Yoshioka, M., Gulli, R., Miura, S., Kim, Y.S. (1989). Identification of proline-specific carboxypeptidase localized to brush border membrane of rat small intestine and its possible role in protein digestion. *Digestive Diseases and Sciences* 34: 400-406.
- Fairweather-Tait, S., Lynch, S., Hotz, C., Hurrell, R., Abrahamse, L., Beebe, S., Bering, S., Bukhave, K., Glahn, R., Hambidge, M., Hunt, J., Lonnerdal, B., Miller, D., Mohktar, N., Nestel, P., Reddy, M., Sandberg, A.S., Sharp, P., Teucher, B., Trinidad, T.P. (2005). The usefulness of *in vitro* models to predict the bioavailability of iron and zinc: A consensus

- statement from the HarvestPlus expert consultation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 75: 371-374.
- FAO/OMS (2002). Iron. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand. pp. 195-222.
- FAO/OMS (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report a joint FAO/WHO expert consultation. Geneva, Switzerland, *World Health Organization. Technical Reports Series* n° 196.
- Farrell Jr, H. M., Jiménez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. y Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.
- Ferraretto, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A., Tettamanti, G. (2003). Casein-derived bioactive phosphopeptides: role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. *FEBS Letters* 551: 92-98.
- Fernández-Tomé, S., Ramos, S., Cordero-Herrera, I., Recio, I., Goya, L., Hernández-Ledesma, B. (2014). *In vitro* chemo-protective of bioactive peptide lunasin against oxidative stress in human HepG2 cells. *Food Research International* 62: 793-800.
- FitzGerald, R.J. (1998). Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal* 8: 451-457.
- Flint, H.J. (2012). The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews* 70: S10-S13.
- Foltz, M., van der Pijl, P.C., Duchateau, G.S. (2010). Current *in vitro* testing of bioactive peptides is not valuable. *The Journal of Nutrition* 140: 117-118.
- Fu, T.J., Abbott, U.R., Hatzos, C. (2002). Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7154-7160.
- Gálvez, A.F., Chen, N., Macasieb, J., de Lumen, B.O. (2001). Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research* 61: 7473-7478.
- Gamberini, M.T., Skorupa, L.A., Souccar, C., Lapa, A.J. (1991). Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 137-139.

- García-Nebot, M.J., Alegría, A., Barberá, R., Contreras, M.M., Recio, I. (2010). Milk versus caseinophosphopeptides added to fruit beverage: Resistance and release from simulated gastrointestinal digestion. *Peptides* 31: 555-561.
- García-Nebot, M.J., Recio, I., Hernández-Ledesma, B. (2014). Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry Toxicology* 65: 155-61.
- Gaucheron, F. (2001). Iron fortification in the dairy industry. *Trends in Food Science and Technology* 11: 403-409.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H.M., de Coppet, P., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Cherbut, C., Hoebler, C. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 287: 1168-1174.
- Gianazza, E., Eberini, I., Arnoldi, A., Wait, R., Sirtori, C.R. (2003). A proteomic investigation of isolated soy proteins with variable effects in experimental and clinical studies. *The Journal of Nutrition* 133: 9-14.
- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I. (2004a). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1054: 269-277.
- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I. (2004b). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 14: 1075-1080.
- Gómez-Ruiz, J.Á., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., Ramos, M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 223: 595-601.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* 30: 591-600.
- Guijarro-Díez, M., García, M.C., Crego, A.L., Marina, M.L. (2014). Off-line two dimensional isoelectrofocusing-liquid chromatography/mass spectrometry (time of flight) for the determination of the bioactive peptide lunasin. *Journal of Chromatography A* 1371: 117-124.

- Guilloteau, P., Romé, V., Delaby, L., Mendy F., Roger, L., Chayvialle, J.A. (2009). A new role of phosphopeptides as bioactive peptides released during milk casein digestion in the young mammal: Regulation of gastric secretion. *Peptides* 30: 2221-2227.
- Guo, M.R., Fox, P.F., Flynn, A., Kindstedt, P.S. (1995). Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science* 78: 2336-2344.
- Guo, L., Harnedy, P.A., Li, B., Hou, H., Zhang, Z., Zhao, X., FitzGerald, R.J. (2014). Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science and Technology* 37: 92-105.
- Guo, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Z., Wang, S., Zhao, X. (2013). Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. *Process Biochemistry* 48: 988-993.
- Hajela, N., Pande, A. H., Sharma, S. Rao D. N., K. Hajela (1999). Studies on a double headed protease inhibitor from *Phaseolus mungo*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 8: 57-60.
- Hambling, S.G., McAlpine, A.S., Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins*, Fox, P.F. (Ed.). Elsevier Science Publishers, London, UK, pp.140-191.
- Hammond, E.G., Murphy, P.A., Johnson, L.A. (2003). Soy (soya) beans properties and analysis. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., and Finglas, P. (Eds.). Academic Press, London, UK, pp. 5389-5392.
- Han, K.S., Deglaire, A., Senygupta, R., Moughan, P. (2008). Hydrolyzed casein influences mucin gene expression in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5572-5576.
- Hansen, M., Sandström, B., Lönnnerdal, B. (1996). The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. *Pediatric Research* 40: 547-552.
- Hayashida, K., Takeuchi, T., Shimizu, H., Ando, K., Harado, E. (2003b). Lactoferrin enhances opioid mediated analgesia via nitric oxid in the rat spinal cord. *American Journal of Physiology* 285: R306-R312.

- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N.A., Gray, G.M., Khosla, C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283: 996-1003.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I. (2004). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *International Dairy Journal* 14: 889-898.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M.M., Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165: 23-35.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I. (2013). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24: 213-221.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., de Lumen, B.O. (2009). Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry* 115: 574-580.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., de Lumen, B.O. (2010). Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation, *Molecular Nutrition & Food Research* 55: 989-998.
- Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1041-1048.
- Hernández-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L., Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal* 17: 42-49.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173: 639-646.
- Hirayama, M., Toyota, K., Hidaka, H., Naito, H. (1992). Phosphopeptides in rat intestinal digests after ingesting casein phosphopeptides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56: 1128-1129.

- Ho, C.H., Chang, C.J., Liu, W.B., Peh, H.C., Chen, S.E., Chen, H.Y., Hui, Y., Hoa, T.H., Chena, M.T., Nagahata, H. (2010). In situ generation of milk protein-derived peptides in drying-off cows. *Journal of Dairy Research* 77: 487-497.
- Hsieh, C.C., Hernández-Ledesma, B., de Lumen, B.O. (2010a). Lunasin, a novel seed peptide, sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to aspirin-arrested cell cycle and induced apoptosis. *Chemistry Biology Interaction* 186: 127-34.
- Hsieh, C.C., Hernández-Ledesma, B., de Lumen, B.O. (2010b). Soybean peptide lunasin suppresses in vitro and in vivo 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene-induced tumorigenesis. *Journal of Food Science* 9: H311-H316.
- Hsieh, C.C., Hernández-Ledesma, B., Jeong, H.J., Park, J.H. de Lumen, B.O. (2010c). Complementary roles in cancer prevention: protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. *PLoS ONE* 5: e8890.
- Huang, G., Ren, Z., Jiang, J. (2011). Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology* 4: 1527-1532.
- Huang, G., Ren, Z., Jiang, J., Chen, W. (2012). Purification of a hepta-peptide with iron binding activity from shrimp processing by-products hydrolysates. *Advance Journal of Food Science and Technology* 4: 207-212.
- Hurrell, R.F., Lynch, S.R., Trinidad, T.P., Dassenko, S.A., Cook, J.D. (1989). Iron-absorption in humans as influenced by bovine-milk proteins. *American Journal of Clinical Nutrition* 49: 546-552.
- I**DF (1964). Determination of moisture content. IDF Standard 26. Brussels, Belgium.
- IDF (1993). Determination of nitrogen content. IDF Standard 20B. Brussels, Belgium.
- Ineu, R.P., Pereira, M.E., Aschner, M., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. (2008). Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 46 3023-3029.
- Ito, H., Satsukawa, M., Arai, E., Sugiyama, K., Sonoyama, K., Kiriya, S., Morita, T. (2009). Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats. *Journal of Nutrition* 139: 1640-1647.
- J**akobsson, I., Lindberg, T., Benediktsson, B. (1982). In vitro digestion of cow's milk proteins by duodenal juice from infants with various gastrointestinal disorders. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1: 183-191.

- Janatova, J., Fuller, J.K., Hunter, M.J. (1968). The heterogeneity of bovin albumin with respect to sulfhydryl and dimer content. *Journal of Biological Chemistry* 243: 3612-3622.
- Jarmołowska, B., Krawczuk, S. (2012). The influence of storage on contents of selected antagonist and agonist opioid peptides in fermented milk drinks. *Milchwissenschaft* 67: 130-133.
- Jarmolowska, B., Szlapka-Sienkiewicz, E., Kostyra, E., Kostyra, H., Mierzejewska, D., Marcinkiewicz-Darmochwa1, K. (2007). Opioid activity of humana formula for newborns. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 2247-2250.
- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Hsieh, C.C., Hernández-Ledesma, B., de Lumen, B.O. (2010). Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in in vivo and in vitro studies. *Nutrition and Cancer* 62: 1113-1119.
- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Kim, D.S., de Lumen, B.O. (2007a). Inhibition of core hystone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55: 632-37.
- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Kim, D.S., Park, J.H., Lee, J.B., Kweon, D.H., Chung, G.Y., Seo, E.W., de Lumen, B.O. (2007b). The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letter* 255: 42-8.
- Jeong, J.B., Jeong, J.J., Park, J.H., Lee, S.H., Lee, J.R., Lee, H.K., Chung, G.Y., Choi, J.D., de Lumen, B.O. (2007c). Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histone H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb) *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55: 10707-10713.
- Jeong, H.J., Lam, Y., de Lumen, B.O. (2002). Barley lunasin suppresses ras-induced colonyformation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 50: 5903-5908.
- Jeong, H.J., Lee, J.R., Jeong, J.B., Park, J.H., Cheong, Y.K., de Lumen, B.O. (2009). The cancer preventive seed peptide lunasin from rye is bioavailable and bioactive. *Nutrition and Cancer* 61: 680-86.
- Jeong, H.J., Park, J.H., Lam, Y., de Lumen, B.O. (2003). Characterization of lunasin isolated from soybean, *Journal of Agriculture of Food Chemistry* 51:7901-7906.
- Jonckheere, N., Skrypek, N., Van Seuningen, I. (2014). Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1846: 142-151.

- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carillo, W., López-Fandiño, R., Molina, E. (2011). Susceptibility of lysozyme to *in-vitro* digestión and immunoreactivity of its digest. *Food Chemistry* 127: 1719-1726.
- Juan-García, A., Font, G., Juan, C., Picó, Y. (2009). Nanoelectrospray with ion-trap mass spectrometry for the determination of beta-casomorphins in derived milk products. *Talanta* 80: 294-306.
- Juge, N. (2008). Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology* 20: 30-39.
- Jung, W.K., y Kim, S.K. (2007). Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology* 224: 763-767.
- Kamau, S.M., Cheison, S.C.H., Chen, W., Liu, X.M., Lu, R.R., (2010). Alpha-Lactalbumin: its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 197-212.
- Karava, N.B., Mahoney, R.R. (2011). Lyophilization decreases the formation of dialyzable iron by extraction and digestion of chicken breast muscle. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62: 397-403.
- Kasai T., Honda T., Kiriya S. (1992). Caseinphosphopeptides (CPP) in feces of rats fed casein diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56: 1150-1151.
- Kawahara, T., Aruga, K., Otani, H. (2005). Characterization of casein phosphopeptides from fermented milk products. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 51: 377-381.
- Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner, J.L., y Sigman C.C. (2000). Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *Journal of Nutrition* 130: 467S-71S.
- Kenny, A.J., y Maroux, S. (1982). Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiological Reviews* 62: 91-128.
- Kibangou, I.B., Bouhallab, S., Henry, G., Bureau, F., Allouche, S., Blais, A., Guerin, P., Arhan, P., Bougle, D.L. (2005). Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatric Research* 58: 731-734.
- Kim, N., Jung, S., Kim, J., Kim, S., Ahn, H., Song K.B. (2014). Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 57: 91-95.

- Kim, M., Lee, D., Lee, Y. (1995). Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins. *Nutrition Research* 15: 1705-1716.
- Kim, S.B., Seo, I.S., Khan, M.A., Ki, K.S., Lee, W.S., Lee, H.J., Shin, H.J., Kim, H.J. (2007). Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *Journal of Dairy Science* 90: 4033-4042.
- Kitts, D.D. (2005). Antioxidant properties of caseinphosphopeptides. *Trends in Food Science and Technology* 16: 549-554.
- Koch, G., Lange, E., Link, G., Bodeker, R.H., Teschemacher, H. (1994). Analysis of clinical data and plasma levels of β -casomorphin-8 immunoreactive arterial in pregnant and puerperal women. In: *β -casomorphins and related peptides: recent developments*, Brantl, V., and Teschemacher, H. (Eds.). VCH, Wisconsin, USA. pp. 227-239.
- Koch, G., Wiedemann, K., Teschemacher, H. (1985). Opioid activities of human beta-casomorphins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 331: 351-354.
- Kopf-Bolanz, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., Egger, L. (2012). Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *The Journal of Nutrition* 142: 245-250.
- Kunda, P.B., Benavente, F., Catalá-Clariana, S., Giménez, E., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. (2012). Identification of bioactive peptides in a functional yogurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction. *Journal of Chromatography A* 1229, 121-128.
- Lam, Y., Gálvez, A., de Lumen, B.O. (2003). Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines. *Nutrition and Cancer* 47: 88-94.
- Langerholc, T., Maragkoudakis, P. A., Wollgast, J., Gradisnik, L., Cencic, A. (2011). Novel and established intestinal cell line models. An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 22: 11-20.
- Larson, B. L., Heary, J.R., Devery, J.E. (1980). Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *Journal of Dairy Science* 63: 665-671.
- Law, A.J.R., Leaver, J., Banks, J.M., Horne, D.S. (1993). Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC. *Milchwissenschaft* 48: 663-666.

- Law, A.J.R., Horne, D.S., Banks, J.M., Leaver, J. (1994). Heat induced changes in the whey proteins and caseins. *Milchwissenschaft* 49: 125-129.
- Lee, S., Song, K. (2009). Isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52: 290-294.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J. P., Swallow, D., Gum, J. R., Kim, Y. S., Real, F.X., Zweibaum, A. (1993). Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *Journal of Cell Science* 106: 771-783.
- Liévin-Le, M.V., Servin, L.A. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 315-337.
- López-Expósito, I., Amigo, L., Recio, I. (2012). A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Science and Technology* 92: 419-438.
- Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C. (1983). Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry* 22: 4567-4573.
- Lund, M., Ardö, Y. (2004). Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe (III) affinity chromatography and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6616-6622.
- Lv, Y., Liu, Q., Bao, X., Tang, W., Yang, B., Guo, S. (2009). Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4593-4597.
- Lyons, T.J., Eide, D.J. (2007). Transport and storage of metal ions in biology. In: *Biological Inorganic Chemistry*, Bertini, H.B., Gray, E.I., Stiefel, J.S., Valentine, J.S. (Eds.). University Science Books, Sausalito, CA. pp. 57-77.
- Lynch, S.R. (2005). The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Practice and Research Clinical Hematology* 18: 333-346.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysates produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* 79: 1316-1321.

- Macierzanka, A., Sancho, A.I., Mills, E.N.C., Rigby, N.M., Mackie, A.R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of beta-casein and beta-lactoglobulin. *Soft Matter* 5: 538-550.
- Maggo, S., Malhotra, S.P., Dhawan, K., Singh, R. (1999). Purification and characterization of protease inhibitor from rice bean (*Vigna umbellata* T.) seeds. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 8: 61-65.
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L., Bublin, M., Gaier, S., Graser, G., Ladics, G.S., Mierzejewska, D., Vassilopoulou, E., Vissers, Y.M., Zuidmeer, L., Rigby, N.M., Salt, L.J., Defernez, M., Mulholland, F., Mackie, A.R., Wickham, M.S.J., Mills, E.N.C. (2009a). In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55: 372-381.
- Marín-Manzano, M. C., Ruiz, R., Jiménez, E., Rubio, L. A., Clemente, A. (2009). Anti-carcinogenic soyabean Bowman-Birk inhibitors survive faecal fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition *in vitro*. *British Journal of Nutrition* 101: 967-971.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., de Pascual-Teresa, S., Reverón, I., Muñoz, R., Recio, I. (2012). Food-derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8600-8605.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Ramos, M., Recio, I. (2013). Effect of β -lactoglobulin hydrolysate and β -lactorphan on intestinal mucin secretion and gene expression in human goblet cells. *Food Research International* 54: 1287-1291.
- Matsui, T., Okumura, H., Yano, H. (2002). Absorption of zinc from dietary casein phosphopeptide complex with zinc in rats given a soybean protein-based diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 48: 247-250.
- Matsumoto, H., Shimokawa, Y., Ushida, Y., Toida, T., Hayasawa, H. (2001). New biological function of bovine α -lactoalbumin: Protective effect against ethanol and stress induced gastric mucosal injury in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 1104-1111.
- Mazanek, M., Roitinger, E., Hudeczb, O., Hutchins, J.R.A., Hegemann, B., Mitulović, G., Taus, T., Stingl, C., Peters, J.M., Mechtler, K. (2010). A new acid mix enhances phosphopeptide enrichment on titanium- and zirconium dioxide for mapping of phosphorylation sites on protein complexes. *Journal of Chromatography B* 878: 515-524.

- McDonagh D., FitzGerald, R.J. (1998). Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *International Dairy Journal* 8: 39-45.
- Megias, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology* 41: 1973-1977.
- Meisel, H., Bernard, H., Fairweather-Tait, S., FitzGerald, R.J., Hartmann, R., Lane, C.N., McDonagh, D., Teucher, B., Wal, J.M. (2003). Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *British Journal of Nutrition* 89: 351-358.
- Meisel, H., FitzGerald, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9: 1289-1295.
- Meisel, H., Frister, H. (1989). Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein. *Journal of Dairy Research* 56: 343-349.
- Mellander, O., Folsch, G. (1972). Enzyme resistance and metal binding of phosphorylated peptides. In: *Protein and amino acid function*, Bigwood E.J. (Ed.). Pergamoon Press Inc, New York pp. 569-579.
- Mezzaroba, L.F.H., Carvalho, J.E., Ponezi, A.N., Antonio, M.A., Monteiro, K.M., Possenti, A., Sgarbieri, V.C. (2006). Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal* 16: 1005-1012.
- Mierke, D.F., Nobner, G., Schiller, P.W., Goodman, M. (1990). Morphicetin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline. *International Journal of Peptide Research*. 56: 357-362.
- Miquel, E., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. (2006a). Identification of novel phosphopeptides after simulated digestion of alpha(s2)-casein by tandem mass spectrometry. *Food Science and Technology International* 12: 531-537.
- Miquel, E., Gómez, J.A., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Recio, I. (2005). Identification of casein phosphopeptides released after simulated digestion of milk-based infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3426-3433.
- Miquel, E., Gómez, J.A., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Recio, I. (2006b). Identification of casein phosphopeptides in beta-casein and commercial hydrolysed casein by mass spectrometry. *Food Science and Technology International* 12: 397-384.

- Miquel, E., Gómez, J.A., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Recio, I. (2006c). Identification of casein phosphopeptides after simulated gastrointestinal digestion by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 222: 48-53.
- Miquel, E., Farré, R., (2007). Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends in Food Science & Technology* 18: 139-143.
- Mittal, V.A., Ellis, A., Ye, A., Das, S., Singh, H. (2015). Influence of calcium depletion on iron-binding properties of milk. *Journal of Dairy Science* 98: 2103-2113.
- Monaco, H.L., Zanotti, G., Spadon, P. (1987). Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 197: 695-706.
- Moughan, P.J., Rutherfurd, S.M., Balan, P. (2013). Kiwifruit, mucins, and the gut barrier. *Advances in Food and Nutrition Research* 68: 169-185.
- Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodríguez, F., Arana Cuenca, A., Téllez Jurado A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International* 17: 293-317.
- Naito, H., Suzuki, H. (1974). Further evidence for formation *in vivo* of phosphopeptide in intestinal lumen from dietary beta-casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 38: 1543-1545.
- Nakurte, I., Klavins, K., Kirhnere, I., Namniece, J., Adlere, L., Matvejevs, J., Kronberga, A., Kokare, S., Strazdina, V., Legzdina, L. (2012). Discovery of lunasin peptide intritricale (X *Triticosecale* Wittmack). *Journal of Cereal Science* 56: 510-514.
- Nakurte, I., Kirhnere, I., Namniece, J., Saleniece, K., Krigere, L., Mekss, P., Vicupe, Z., Bleidere, M., Legzdina, L. Muceniece, R. (2013). Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Cereal Science* 57: 319-324.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2013). Chapter 5. Pages 157-189 in *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman Publishers, New York.
- Niv, Y., Boltin, D. (2012). Secreted and membrane-bound mucins and idiopathic peptic ulcer disease. *Digestion* 86: 258-263.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J. (2012). Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Research* 46: 234-267.

- Oates, P.J., Hakkinen, J.P. (1988). Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology* 94: 10-21.
- Odani, S., Koide, T., Ono, T. (1987). Amino acid sequence of a soybean (*Glycine max*) seed polypeptide having a poly (L-aspartic acid) structure. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 10502-10505.
- O'Keeffe, M.B., FitzGerald R.J. (2014). Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. *International Dairy Journal* 36: 128-135.
- O'Loughlin, I.B., Murray, B.A., Fitzgerald, R.J., Brodkorb, A., Kelly, P.M. (2014). Pilot-scale production of hydrolysates with altered bio-functionalities based on thermally-denatured whey protein isolate. *International Dairy Journal* 34: 146-152.
- OMS (2001). Iron deficiency anemia: Assessment, prevention and control. Geneva, Switzerland. World Health Organisation. pp. 1-22.
- Ong, L., Shah, N.P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Food Science and Technology* 41: 1555-1566.
- Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H., El-Shabrawy, S.A. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal* 17: 488-503.
- Otte, J., Zakora, M., Qvist, K.B., Olsen, C.E., Barkholt, V. (1997). Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. *International Dairy Journal* 7: 835-848.
- Ou, K., Liu, Y., Zhang, L., Yang, X., Huang, Z., Nout, M.J.R., Liang, J. (2010). Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells. *Journal Agriculture of Food Chemistry* 58: 4894-4900.
- Pabona, J.M.P., Dave, B., Su, Y., Montales, M.T.E., de Lumen, B.O., de Mejia, E., Rahal, O.M. (2013). The soybean peptide lunasin promotes apoptosis of mammary epithelial cells via induction of tumor suppressor PTEN: similarities and distinct actions from soy isoflavone genistein. *Genes & Nutrition* 8: 79-90.

- Pacheco, M.T.B., Bighetti, E.A., Antônio, M., Carvalho, J.E., Possenti, A., Sgarbieri, V.C. (2006). Antiulcerogenic activity of fraction and hydrolysate obtained from whey protein concentrate. 382 *Brazilian Journal of Food Technology* 3: 15-22.
- Park, J.H., Jeong, H.J., de Lumen, B.O. (2007). *In vitro* digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. *Journal Agriculture of Food Chemistry* 55: 10703-10706.
- Pasi, A., Mahler, H., Lansel, N., Bernasconi, C., Messiha, F. S. (1993). Beta-casomorphin immunoreactivity in the brain-stem of the human infant. *Research Communication Chemie Pathology Pharmacology* 80: 305-322.
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M., Farré, R. (2006). Bioavailability of zinc from infant foods by *in vitro* methods (solubility, dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 971-978.
- Pèrès, J.M., Bouhallab, S., Bureau, F., Neuville, D., Maubois, J.L., Devroede, G , Arhan, P., Bouglé, D. (1999). Mechanisms of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. *Journal of Nutritional Biochemistry* 10: 215-222.
- Pérez, O.E., David-Birman,T., Kesselman, E., Levi-Tal, S., Lesmes, U. (2014). Milk proteinevitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on *in vitro* gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids* 38: 40-47.
- Pérez-Vilar, J., Hill, R.L. (2004). Mucin family of glycoproteins. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2: 758-764.
- Perrin, D.D. (1958). The stability of complexes of ferric ion and amino-acids. *Journal of the Chemical Society* 3:125-3128.
- Peters, T. (1995). Serum albumin. *Advances in Protein Chemistry* 37: 161.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R., O'Brien, N. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal* 19: 643-654.
- Philippe, M., Le Graet, Y., Gaucheron, F. (2005). The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry* 90: 673-683.
- Phillipson, M., Johansson, M.E.V., Henriksnäs, J., Petersson, J., Gendler, S.J., Sandler, S., Persson, A.E., Hansson, G.C., & Holm, L. (2008). The gastric mucus layers: Constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 295: 806-812.

- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O. Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S., Addeo, F. (2010). Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. *Journal Chromatography B* 878: 295-308.
- Pihlanto, A., Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research* 47: 47004-47006.
- Pinto, G., Caira, S., Cuollo, M., Lilla, S., Chianese, L., Addeo, F. (2012). Bioactive casein phosphopeptides in dairy products as nutraceuticals for functional foods. In: *Milk Protein*, Hurley, W.L. (Ed.). InTech Open Science. Croatia, pp. 3-44.
- Plaisancié, P., Claustre, J., Estienne, M., Henry, G., Boutrou, R., Paquet, A., Léonil, J. (2013). A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24: 213-221.
- Potrich, F.B., Allemand, A., da Silva, L.M., dos Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mendes, D.A., Andre, E., Werner, M.F., Marques, M.C. (2010). Antiulcerogenic activity of 385 hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 85-92.
- Qi, P.X. (2007). Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait* 87: 363-383.
- Quirós, A., Contreras, M.M., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30: 1848-1853.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science* 88: 3480-3487.
- Qureshi, T.M., Vegarud, G.E., Abrahamsen, R.K., Skeie, S. (2013). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of the Norwegian autochthonous cheeses Gamalost and Norvegia after in vitro human gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science* 96: 838-853.
- Rayaprolu, S.J., Hettiarachchy, N.S., Chen, P., Kannan, A., Mauromostakos, A. (2013). Peptides derived from high oleic acid soybean meals inhibit colon, liver and lung cancer cell growth. *Food Research International* 50: 282-288.
- Reynolds, E.C. (2003). Dairy components in oral health. *Australian Journal of Dairy Technology* 58: 79-81.

- Reynolds, E.C., Riley, P.F., Adamson, N.J. (1994). A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification. *Analytical Biochemistry* 217: 277-284.
- Ribadeau-Dumas, B. Protéines du lait: structure et fonctions. In: *Biologie de la lactation*, Martinet, J., Houdebine, L.M. (Eds). INRA. France, (1993), pp. 491-516.
- Riera, F.A., Álvarez, R., Arguello, M.A., Cabero, M. (1996). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo (I). *Industrias Lácteas Españolas* 206: 49-61.
- Robert, A. (1979). Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77: 761-767.
- Robert, A. (1987). Effects of drugs on gastric secretion. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 393 2nd ed. (Johnson LR, ed.). Raven Press, New York, pp. 1071-1088.
- Rosaneli, C.R., Bighetti, A.E., Antonio, M.A, Carvalho, J.E., Sgarbieri, V.C. (2002). Efficacy of a whey protein concentrate of the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. *Journal of Medicine Food* 4: 221-228.
- Roussel, P., Lamblin, G., Lhermitte, M., Houdret, N., Lafitte, J.J., Perini, J.M., Klein, A., Scharfman, A. (1988). The complexity of mucins. *Biochimie* 70: 1471-1482.
- Rui, X.U. (2009). Calcium binding of peptides derived from enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology* 62:170-173.
- Sánchez, L., Peiró, J.M., Castillo, H., Pérez, H.M.D., Ena, J.M., Calvo, M. (1992). Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *Journal of Food Science* 57: 873-879.
- Sánchez-Rivera, L., Diezhandino, I., Gómez-Ruiz, J. A., Fresno, J. M., Miralles, B., Recio, I. (2014). Peptidomic study of Spanish blue cheese (Valdeón) and changes after simulated gastrointestinal digestion. *Electrophoresis* 35: 1627-1636.
- Sato, R., Shindo, M., Gunshin, H., Noguchi, T., Naito, H. (1991). Characterization of phosphopeptide derived from bovine beta-casein: an inhibitor to intra-intestinal precipitation of calcium phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1077: 413-415.
- Schmelzer, C.E.H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R.H.H., Raith, K. (2007). Peptic digestion of beta-casein time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography A* 1166: 108-115.

- Schümann, K., Ettle, T., Szegner, B., Elsenhans, B., Solomons, N.W. (2007). On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21: 147-168.
- Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors* 21: 43-47.
- Shimizu, M. (2010). Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74: 232-241.
- Shimizu M., Son D.O. (2007). Food-derived peptides and intestinal functions. *Current Pharmaceutical Design* 13: 885-895.
- Sienkiewicz-Szlapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H., Iwan, M. (2009). Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal* 19: 258-263.
- Singh, K., Bisetty, K.A. (2012). Molecular dynamics study of lunasin S. *Afr. Journal Chemistry* 65: 115-124.
- Slomiany, B.L., Slomiany, A. (2002). Disruption in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide involves ERK and p38 mitogen-activated protein kinase participation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294: 220-224.
- Smithers, G.W. (2008). Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal* 18: 695-704.
- SoyLabs (2012). <http://www.lunasin.com/About.aspx>.
- Spackman D.H., Stein, W. H., Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* 30: 1190-1206.
- Sprong, R.C., Schonewille, A.J., van der Meer, R. (2010). Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: role of mucin and microbiota. *Journal of Dairy Science* 93: 1364-1371.
- Storcksdieck, S., Bonsmann, G., Hurrell R.F. (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *Journal Food Science* 72: S19-S29.
- Su, R., Qi, W., He, Z., Yuan, S., Zhang, Y. (2007). Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Identification and release kinetics of phosphopeptides. *Food Chemistry* 104: 276-286.

- Sugiarto, M., Ye, A., Singh, H. (2009). Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. *Food Chemistry* 114: 1007-1013.
- Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M., Akhtar, M. (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioapplied Sciences* 3: 361-367.
- Svedberg, J., De Haas, J., Leimenstoll, G. (1985). Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6: 825-830.
- Svenning, C., Vegarud, G.E. (1998). In: *Proceeding "Dairy Foods in Health."* IDF. Nutrition Week, New Zealand, pp.12.
- Swaigood, H.E. (1992). Chemistry of the caseins. In: *Advanced Dairy Chemistry-1, Proteins*, Fox, P.F., (Ed.) Elsevier Applied Science, London, pp. 63-110.
- Szabo, S., Gallagher, G.T., Horner, H.C., Frankel, P.W., Underwood, R.H., Konturek, S. J., Brzozowski, T., Trier, J.S. (1983). Role of the adrenal cortex in gastric mucosal protection by prostaglandins, sulfhydryls, and cimetidine in the rat. *Gastroenterology*, 85: 1384-1390.
- Szabo, S., Nagy, L., Prevebani, M. (1992). Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteinases in gastric mucosal injury and protection. *Clinica Chimica Acta*. 206: 95-105.
- Tai, E.K.K., Wong, H.P.S., Lam, E.K.Y., Wu, W.K.K., Yu, L., Koo, M.W.L., Cho, C.H. (2008). Cathelicidin stimulates colonic mucus synthesis by up-regulating muc1 and muc2 expression through a mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 104: 251-258.
- Tanabe, H., Sugiyama, K., Matsuda, T., Kiriya, T., Morita, T. (2005). Small intestinal mucins are secreted in proportion to the settling volume in water of dietary indigestible components in rats. *Journal of Nutrition* 135: 2431-2437.
- Tarnawski, A.S., Ahluwalia, A., Jones, M.K. (2012). The mechanisms of gastric mucosal injury: Focus on microvascular endothelium as a key target. *Current Medicinal Chemistry* 19: 4-15.
- Tavares, T.G., Monteiro, K.M., Possenti, A., Pintado, M.E., Carvalho, J.E., Malcata, F.X. (2011). Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *cynara cardunculus*. *International Dairy Journal* 21: 934-939.
- Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers-Peptide Science Section* 43: 99-117.

- Trivedi, M.V., Laurence, J. S., Siahaan, T. J. (2009). The role of thiols and disulfides on protein stability. *Current Protein & Pepide. Science*. 10: 614-625.
- Tomé, D., Ben Mansour, A., Hautefeville, M., Desjeux, J.F. (1987). Opiate activity and transepithelial passage of β -casomorphins in rabbit ileum. *American Journal of Physiology* 253: 737-744.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry* 134: 1585-1588.
- Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., García, H.S., Vallejo-Córdova, B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 94: 3794-3800.
- Trompette, A., Claustre, J., Caillon, F., Jourdan, G., Chayvialle, J.A., Plaisancié P. (2003). Milk bioactive peptides and β -casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *Journal of Nutrition* 133: 3499-3503.
- Tsuchiya, T., Takeuchi, T., Hayashida, K., Shimizu, H., Ando, K., Harada, E. (2006). Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia. *Brain Research* 1068: 102-108.
- Tulipano, G., Bulgari, O., Chessa, S., Nardone, A., Cocchi, D., Caroli A. (2010). Direct effects of casein phosphopeptides on growth and differentiation of *in vitro* cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Regulation Peptides* 160: 168-174.
- Ushida, Y., Shimokawa, Y., Matsumoto, H., Toida, T., Hayasalva, H. (2003). Effects of bovine α -lactalbumin on gastric defense mechanisms in naïve rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67: 577-583.
- Ushida, Y., Shimokawa, Y., Toida, T., Matsui, H., Takase, M. (2007). Bovine α -Lactalbumin stimulates mucus metabolism in gastric mucosa. *Journal of Dairy Science* 90: 541-546.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A., Velcich, A., Meijerink, J., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, B.I., Einerhand, W.C.A. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131: 117-129.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295: 6-9.

- Wallace, J.L., Granger, D.N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB Journal* 10: 731-740.
- Walstra, P., Jenness, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. JohnWiley and Sons, New York, pp. 1-11.
- Wang, B., Li, B., Ao, J. (2012). Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 134: 1231-1238.
- Wang, X., Ai, T., Meng, X.L., Zhou, J., Mao, X.Y. (2014). *In vitro* iron absorption of α -lactalbumin hydrolysate-iron and β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *Journal of Dairy Science* 97: 2559-2566.
- Wickham, M., Faulks, R., Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research* 53: 952-958.
- Withney E., Rolfes S.R., (2008). Understating nutrition, 11th edn. Thomas Wadsworth, Belmont.
- Wolfson, L.M., Summer, S.S. (1993). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review. *Journal of Food Protection* 56: 887-892.
- Wu, H., Liu, Z., Zhao, Y., Zeng, M. (2012). Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. *Food Research International* 48: 435-441.
- Yaron, A., Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28: 31-81.
- Yoshikawa, M., Tani, F., Shiota, H., Usui, H., Kurahashi, K., Chiba, H. (1994). Casoxin D, an opioid antagonist/ileumcontracting/vasorelaxing peptide derived from human casein. In: *β -casomorphins and related peptides: recent developments*. Brantl, V. and Teschemacher, H. (Eds.). VCH, Weinheim. pp. 43-48.
- Yoshioka, M., Erickson, R.H., Woodley, J.F., Gulli, R., Guan, D., Kim, Y.S. (1987). Role of rat intestinal brush-border membrane angiotensin-converting enzyme in dietary protein digestion. *American Journal of Physiology* 253: G781-G786.
- Zhao, L., Wang, Z., Xu, S.Y. (2007). Preparation of casein phosphorylated peptides and casein non-phosphorylated peptides using alcalase. *European Food Research and Technology* 225: 579-584.

Zhou, J., Wang, X., Ai, T., Cheng, X., Guo, H.Y., Teng, G.X., Mao, X.Y. (2012). Preparation and characterization of β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *Journal of Dairy Science* 95: 4230-4236.

ANEXOS



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idaairyj

Casein hydrolysate and derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in human intestinal cells



Daniel Martínez-Maqueda, Beatriz Miralles, Elvia Cruz-Huerta, Isidra Recio*

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC), Nicolás Cabrera, 9, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form

12 March 2013

Accepted 25 March 2013

ABSTRACT

The present study was undertaken to explore if a casein hydrolysate and four component peptides with probable ability to interact with opioid receptors can exert a stimulatory effect on mucin production in human intestinal cells (HT29-MTX). α_{S1} -Casein fragments 143–149 (AYFYPEL) and 144–149 (YFYPEL), and the casein hydrolysate, significantly increased expression of MUC5AC, the major secreted mucin gene in this cell line, over 1.7-fold basal level after 4 h of exposure. The determination of mucin-like glycoproteins showed a higher effect on mucin secretion by the casein hydrolysate (210% of controls) than that of AYFYPEL and YFYPEL (around 160%). Therefore, peptides or other components may participate in the activity of the hydrolysate in a synergistic way or through a non-opioid mechanism. In conclusion, a casein hydrolysate and two derived peptides, AYFYPEL and YFYPEL, promote the mucin production and may support the development of functional foods to improve mucus barrier and its protective role in gastrointestinal diseases.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The role of proteins, either directly or after hydrolysis, as physiologically active components in the diet is being increasingly acknowledged. Peptide sequences can be released from the precursor food proteins by *in vivo* gastrointestinal digestion and by *in vitro* processes such as fermentation, controlled enzymatic hydrolysis or reactions occurring during food storage (e.g., cheese ripening). The term “food-derived bioactive peptides” is related to dietary peptide sequences that may exert an *in vivo* biological function. Among them, interest is growing in those peptides that exhibit effects on the intestine, especially modulatory activities (Shimizu, 2010). There are several reports describing the role of food-derived bioactive peptides increasing gut secretory and absorptive capacity (Moughan, Fuller, Han, Kies, & Miner-Williams, 2007). For instance, the release of hormones such as cholecystokinin, gastrin, and somatostatin can be influenced by peptide hydrolysates (Foltz et al., 2008). The intestinal epithelium constitutes a large surface between the body and the exterior milieu, being continuously exposed to food toxins, pathogens and the changing luminal conditions such as pH changes or the action of proteolytic enzymes. These factors may have a negative impact on the functions of intestinal cells.

The intestinal mucus layer plays a protective role as a barrier between the epithelium and the luminal content. Mucins, which are high molecular weight glycoproteins, represent the main component responsible for the intestinal mucus structure and its protective properties. Mucins are produced by goblet cells and any quantitative or qualitative modification of their synthesis may affect the efficiency of the protection. Fortunately, certain dietary components have been shown to positively influence the producing of mucus. Examples of these dietary components are some short-chain fatty acids and dietary fibres that increase mucin synthesis or the goblet cell number (Barcelo et al., 2000; Gaudier et al., 2004). Of note, a casein-derived peptide with reported opioid activity, β -casomorphin 7, exhibited an enhanced mucin secretion and mucin gene over-expression mediated by μ -opioid receptors in two models (human and rat) of intestinal goblet cells (Zoghbi et al., 2006). In rat jejunum, it has been also demonstrated *ex-vivo* that luminal administration of β -casomorphin 7 and commercial hydrolysates of casein and α -lactalbumin induced mucin release through a nervous pathway and opioid receptor activation (Claustre et al., 2002; Trompette et al., 2003). In a screening with different food peptides, it was found that several peptides produced a significant increase in secretion of mucins. Furthermore, α -lactophin showed enhanced expression of the mucin gene 5AC (MUC5AC) in intestinal cells (Martínez-Maqueda et al., 2012). Recently, the total peptide pool from a fermented milk showed its effect on the stimulation of gel-forming MUC2 expression as well as mucin secretion in HT29-MTX cells (Plaisancié et al., 2013).

* Corresponding author. Tel.: +34 9 10017940.
E-mail address: irecio@csic.es (I. Recio).



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Review

Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides



Laura Sánchez-Rivera, Daniel Martínez-Maqueda, Elvia Cruz-Huerta, Beatriz Miralles*, Isidra Recio

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM, CEI UAM + CSIC), Nicolás Cabrera, 9. 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 October 2013

Received in revised form 16 January 2014

Accepted 30 January 2014

Available online 13 February 2014

Keywords:

Peptidomics

Mass spectrometry

Bioactive peptide

Bioavailability

Monitoring

Dairy product

ABSTRACT

In the last years, the identification and characterization of bioactive peptides have become emerging research subjects. Food peptidomics can be considered a subfield of the food proteomics focused on composition, interaction and properties of peptides present in a food matrix. On the basis of the description of recent works, the objective of this review is to highlight the increasing role of peptidomics as indispensable tool in the fields of discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. The enhanced peptide identification, resulting from the valuable mass spectrometry development and the regular use of high-resolution techniques, supports the application of peptidomic approaches in the case of empirical bioactive peptide identification workflow. Bioinformatic-driven approaches have gradually gained importance through the wider application of in silico analysis, structure activity relationship models, chemometrics and peptide database management. Investigations of bioactive peptide modifications during digestion, whether it be selective or untargeted search using peptidomic tools have been discussed, as well as peptide changes along absorption, distribution, metabolism and elimination, including studies in cellular and animal models. Examples of application of peptidomics in the analysis of bioactive peptide occurrence in dairy products together with peptide monitoring during scaling up, industrial treatments and storage have been also described.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	170
2. Peptide discovery	171
2.1. Empirical approaches	171
2.2. Bioinformatic-driven approaches	173
3. Bioavailability	174
3.1. Modifications during gastrointestinal digestion	174
3.2. Modifications during absorption	175
3.2.1. Peptidomics in cell line models	176
3.2.2. Peptidomics in ex vivo and in situ models	177
3.3. Absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME)	177
4. Peptidomics for bioactive peptide monitoring	177
4.1. Peptide occurrence in dairy products	177
4.2. Peptide stability during industrial processing	178
5. Future prospects	178
Acknowledgments	179
References	179

1. Introduction

Nutrition exerts an important life-long environmental impact on human health, and this interplay between nutrition and health has been known for centuries (Kussmann, Panchaud, & Affolter, 2010).

* Corresponding author at: Nicolás Cabrera, 9. 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 910017932; fax: +34 910017905.

E-mail address: beatriz.miralles@csic.es (B. Miralles).



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versus simulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product



E. Cruz-Huerta, M.J. García-Nebot, B. Miralles, I. Recio, L. Amigo*

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM, CEI-UAM+CSIC), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2014

Received in revised form 24 June 2014

Accepted 16 July 2014

Available online 24 July 2014

Keywords:

Casein by-product

Caseinophosphopeptides

Simulated gastrointestinal digestion

Tandem mass spectrometry

Tryptic hydrolysis

ABSTRACT

The production of caseinophosphopeptides from a casein-derived by-product generated during the manufacture of a functional ingredient based on antihypertensive peptides was attempted. The casein by-product was submitted to tryptic hydrolysis for 30, 60 and 120 min and further precipitated with calcium chloride and ethanol at pH 4.0, 6.0 and 8.0. Identification and semi quantification of the derived products by tandem mass spectrometry revealed some qualitative and quantitative changes in the released caseinophosphopeptides over time at the different precipitation pHs. The by-product was also subjected to simulated gastrointestinal digestion. Comparison of the resulting peptides showed large sequence homology in the phosphopeptides released by tryptic hydrolysis and simulated gastrointestinal digestion. Some regions, specifically α_{S1} -CN 43–59, α_{S1} -CN 60–74, β -CN 1–25 and β -CN 30–50 showed resistance to both tryptic hydrolysis and simulated digestion. The results of the present study suggest that this casein-derived by-product can be used as a source of CPPs.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Caseinophosphopeptides (CPPs) are phosphorylated bioactive peptides that can be released from casein (CN) by *in vivo* or *in vitro* enzymatic digestion (Bouhallab & Bouglé, 2004). Some are characterized by the presence of three phosphoserine groups followed by two residues of glutamic acid (SpSpSpEE). This motif is localized specifically in the sequences of α_{S1} -CN f(66–70), α_{S2} -CN f(8–12), α_{S2} -CN f(56–60) and β -CN f(17–21). Due to the phosphorylated serines, these regions are relatively resistant to further hydrolysis and it has been proposed that they could prevent the precipitation of metal ions at alkaline pH in the distal small intestine (Fitzgerald, 1998; Zidane et al., 2012). This property implies that CPPs could be used as supplements for fortifying foods, with a view to improving mineral bioavailability. Different applications of CPPs have been reported, such as prevention of osteoporosis, oligoelement supplementation and prevention of dental caries, the latter being the most used therapeutic application (Cross et al., 2007; Nongonierma & Fitzgerald, 2012). In addition, it has been proposed that they may also display immunomodulatory, cytomodulatory and antioxidant activities (Meisel & Fitzgerald, 2003; Phelan, Aherne, Fitzgerald, & Ó'Brien, 2009). Besides, CPPs can influence gastric secretion regulation (Guilloteau et al., 2009), and antimicrobial effects have been also reported (Arunachalam & Raja, 2010).

CPPs have been released from α_{S1} -, α_{S2} -, β - and κ -CN subjected to hydrolysis with different enzymes, such as trypsin, pancreatin, alcalase, plasmin, or combinations of these, such as trypsin and chymotrypsin (Pinto et al., 2012). The hydrolysis conditions, including pH, time, enzyme:protein ratio and temperature, were all different, thereby producing different sequences. In some studies, the digests or hydrolysates are subjected to an enrichment step to isolate the generated CPPs. Selective precipitation of CPPs with CaCl_2 and ethanol is a usual method using pHs in the range 3.5–8.5 (Aoki et al., 1998; Reynolds, Riley, & Adamson, 1994; Zhao, Wang, & Xu, 2007), but immobilized metal affinity chromatography (IMAC) involving different metal ions and titanium dioxide chromatography (Picariello et al., 2010) have also been used. Combination of selective precipitation at pH 7 with gallium IMAC has been recently described (Zhu & Fitzgerald, 2010). It has been reported that at pH 3.5 only peptides containing the phosphorylated cluster sequence SpSpSpEE selectively precipitate from a tryptic digest of casein. However, at pH 4.6, the precipitate contains di- and tri-phosphorylated peptides as well as the cluster peptides. At pH 8.0, all of the cluster peptides and the diphosphorylated peptides as well as the monophosphorylated peptides containing the sequence Ser(P)-Glu-Glu- precipitate, but the other monophosphorylated peptides containing the sequence Ser(P)-Ala-Glu-Glu- and Glu-Ser(P)-Thr-Glu- do not (Reynolds et al., 1994). Whether the pH used during precipitation could determine the characteristics of the products recovered remains to be evidenced using a powerful identification technique such as tandem mass spectrometry (MS/MS).

* Corresponding author. Tel.: +34 910017939; fax: +34 910017905.

E-mail address: lourdes.amigo@csic.es (L. Amigo).

PAPER

Cite this: *Food Funct.*, 2015, 6, 2626

The protective role of the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean lunasin digestion: the effect of released peptides on colon cancer growth†

Elvia Cruz-Huerta,^{‡a} Samuel Fernández-Tomé,^{‡a} M. Carmen Arques,^b Lourdes Amigo,^a Isidra Recio,^a Alfonso Clemente^b and Blanca Hernández-Ledesma^{*a}

Lunasin is a naturally-occurring peptide demonstrating chemopreventive, antioxidant and anti-inflammatory properties. To exhibit these activities, orally ingested lunasin needs to survive proteolytic attack of digestive enzymes to reach target tissues in active form/s. Preliminary studies suggested the protective role of protease inhibitors, such as the Bowman-Birk inhibitor and Kunitz-trypsin inhibitor, against lunasin's digestion by both pepsin and pancreatin. This work describes in depth the behaviour of lunasin under conditions simulating the transit through the gastrointestinal tract in the absence or presence of soybean Bowman-Birk isoinhibitor 1 (IBB1) in both active and inactive states. By liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), the remaining lunasin at the end of gastric and gastro-duodenal phases was quantified. Protection against the action of pepsin was independent of the amount of IBB1 present in the analyzed samples, whereas an IBB1 dose-dependent protective effect against trypsin and chymotrypsin was observed. Peptides released from lunasin and inactive IBB1 were identified by MS/MS. The remaining lunasin and IBB1 as well as their derived peptides could be responsible for the anti-proliferative activity against colon cancer cells observed for the digests obtained at the end of simulated gastrointestinal digestion.

Received 27th April 2015,

Accepted 30th May 2015

DOI: 10.1039/c5fo00454c

www.rsc.org/foodfunction

1. Introduction

Lunasin is a naturally-occurring peptide corresponding to the small subunit peptide of 2S albumin.¹ Its amino acid sequence (SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDD, National Center for Biotechnology Information, NCBI, accession number AAP62458) is characterized by the presence of a predicted α -helix structure, a tri-peptide RGD cell adhesion motif and a continuous sequence of nine aspartic acid residues at the C-terminus. A recent molecular dynamics study of this peptide has suggested the important role played by its α -helicity and highly negatively-charged C-terminal tail in the recognition of and binding to the chromatin residue,

and thus, in the anti-mitotic activity of lunasin in several mammalian cell lines.²

Recent studies have revealed the potential role of lunasin against established breast, colon, and prostate cancer, and leukemia cell lines, through its ability to inhibit cell proliferation by arresting the cell cycle and inducing apoptosis.³ The chemoprotective effects of lunasin against skin,⁴ breast,^{5,6} and colon cancer^{7,8} have also been evaluated in animal models. Moreover, lunasin has been shown to restrain the oxidative status caused by chemical agents in both intestinal Caco-2 and hepatic HepG2 cells, and to inhibit inflammation in cultured RAW 264.7 macrophages. These antioxidant and anti-inflammatory properties have been suggested to contribute to the anti-cancer activity of lunasin.³

Food-derived peptides are expected to exhibit their health beneficial properties after being orally taken. Even though these peptides can elicit hormone-like functions locally in the gastrointestinal tract, they are generally required to flow into the blood to exhibit specific activities at a systemic level. In the last few years, the number of studies evaluating bioavailability aspects of dietary peptides, such as their resistance to digestive enzymes and their absorption/distribution rates has notably increased.⁹ In addition, the application of peptidomics tools

^aInstituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM CEI UAM+CSIC), Nicolás Cabrera, 9, 28049 Madrid, Spain. E-mail: b.hernandez@csic.es; Fax: +34 910017905; Tel: +34 910017970

^bEstación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5fo00454c

* Both authors equally contributed to this work.



Short communication: Identification of iron-binding peptides from whey protein hydrolysates using iron (III)-immobilized metal ion affinity chromatography and reversed phase-HPLC-tandem mass spectrometry

Elvia Cruz-Huerta,* Daniel Martínez Maqueda,* Isidra Recio, Lucia de la Hoz,† Vera S. Nunes da Silva,† Maria Teresa Bertoldo Pacheco,† and Lourdes Amigo*¹

*Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC), Nicolás Cabrera, 9, 28049 Madrid, Spain

†Instituto de Tecnología de Alimentos (CCQA, ITAL), Av. Brasil, 2880, CP 139, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

Peptides with iron-binding capacity obtained by hydrolysis of whey protein with Alcalase (Novozymes, Araucaria, PR, Brazil), pancreatin, and Flavourzyme (Novozymes) were identified. Hydrolysates were subjected to iron (III)-immobilized metal ion affinity chromatography, and the bound peptides were sequenced by mass spectrometry. Regardless of the enzyme used, the domains f(42–59) and f(125–137) from β -lactoglobulin enclosed most of identified peptides. This trend was less pronounced in the case of peptides derived from α -lactalbumin, with sequences deriving from diverse regions. Iron-bound peptides exhibited common structural characteristics, such as an abundance of Asp, Glu, and Pro, as revealed by mass spectrometry and AA analysis. In conclusion, this characterization of iron-binding peptides helps clarify the relationship between peptide structure and iron-chelating activity and supports the promising role of whey protein hydrolysates as functional ingredients in iron supplementation treatments.

Key words: whey protein, enzymatic hydrolysis, iron-binding peptide, reversed phase HPLC-tandem mass spectrometry

Short Communication

Iron constitutes one of the most essential trace elements in human nutrition. According to the World Health Organization (WHO/FAO, 2004), iron deficiency represents one of the most important nutritional disorders worldwide, and is especially common under states of increased iron requirement, insufficient intake, or decreased bioavailability. There has been great interest over the years in the study of metal-chelating

peptides. Recent reports have demonstrated improved iron-binding capacity or bioavailability for peptides from diverse sources (Guo et al., 2014).

Whey, which contains around 20% of milk proteins, represents a major by-product of cheese manufacturing process (Smithers, 2008). Although casein contains more sites and greater affinity to bind iron than whey proteins, due to the presence of phosphoserine residues, the binding of iron by whey proteins has also been described (Sugiarto et al., 2009). In a study for the optimization of the iron-binding capacity for enzymatic hydrolysis of β -LG, Zhou et al. (2012) reported that whole β -LG exhibited the lowest capacity compared with any of the hydrolysates tested. Hydrolysis of whey proteins with different enzymes has been reported to release peptides with iron-chelating capacity; for example, hydrolysates prepared with Alcalase (Novozymes, Araucaria, PR, Brazil; Kim et al., 2007), Corolase PP (AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Germany; O'Loughlin et al., 2014) or papain and Neutrase (Novozymes; Ou et al., 2010). However, only a few iron-binding peptides have been characterized and, to our knowledge, no whey-derived peptides have been yet identified. This lack of knowledge about the relationship between peptide structure and iron-chelating activity prevents researchers from anticipating binding activity based on a peptide's sequence.

The proteolytic activity of Alcalase, pancreatin, and Flavourzyme (Novozymes) on whey proteins is notable compared with that of other enzymes (Kim et al., 2007). Recently, we found that the <5 kDa fraction from whey protein hydrolysates obtained individually with these 3 enzymes showed a marked iron-chelating capacity detected by an enhancement of iron dialyzability (de la Hoz et al., 2014a).

The aim of the current study was to identify peptides with affinity for iron in these hydrolysates, and the comparative analysis of total amino acid profile. The peptide structure required to exhibit iron-binding properties is discussed.

Received May 20, 2015.

Accepted September 4, 2015.

¹Corresponding author: lourdes.amigo@csic.es

DRAFT

“Después de escalar una montaña muy alta, descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar”

Nelson Mandela

